**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

RAQUEL AIZEMBERG

**Emprego do caldo de cana e do melado como adjunto de malte de cevada na
produção de cervejas**

LORENA

2015

RAQUEL AIZEMBERG

**Emprego do caldo de cana e do melado como adjunto de malte de cevada na
produção de cervejas**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de
Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia
Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. João Batista de Almeida e Silva

Co-orientador: Giovani Brandão Mafra de Carvalho

Edição reimpressa e corrigida

LORENA

AGOSTO, 2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Aizemberg, Raquel

Emprego do caldo de cana e do melado como adjunto de malte na produção de cervejas / Raquel Aizemberg; orientador João Batista de Almeida e Silva; co orientador Giovani Brandão Mafra de Carvalho - ed. reimp., corr. - Lorena, 2015.
272 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2015
Orientador: João Batista de Almeida e Silva

1. Adjunto. 2. Caldo de cana. 3. Melado. 4. Fermentação alcoólica. I. Título. II. Silva, João Batista de Almeida e, orient. III. Carvalho, Giovani Brandão Mafra de, co-orient.

Dedico este trabalho a minha filha Julia, que é a luz da minha vida e que “apareceu” justamente durante o meu doutorado, me trazendo muita alegria e felicidade.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente aos meus pais, Daniel Aizemberg e Janete Aizemberg, pois sem eles eu não teria tido a oportunidade de ingressar na universidade e realizar este trabalho de doutorado. Pelo grande incentivo que eles tiveram e por acreditar em mim.

Ao Professor Dr. João Batista de Almeida e Silva pela orientação, amizade, aprendizado e confiança no meu trabalho.

Ao Professor Dr. Giovani Brandão Mafra de Carvalho pela co-orientação e ajuda nas dúvidas surgidas em meu trabalho.

Ao pesquisador Raul Carrillo Ulloa pela ajuda no início do meu ingresso no laboratório.

Ao Prof. Dr. Waldemar Gastoni Venturini Filho e Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha pelas sugestões e críticas em meu Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Denis De Keukeleire e sua esposa Annemie, que me ajudaram de todas as formas possíveis para a realização de parte do meu doutorado na Bélgica. Dois anjos que surgiram na minha vida.

Ao Prof. Dr. Guido Aerts pela supervisão e orientação de parte do meu doutorado na Universidade KU Leuven Technology Campus (KAHO Sint Lieven) e por todas as pessoas que lá me ajudaram do “Laboratoy of Enzyme, Fermentation and Brewing Technology”.

A todos os funcionários e docentes da Escola de Engenharia de Lorena pelos auxílios prestados e pela simpatia durante meu doutorado, em especial para a Sheila Regina Monteiro Pereira.

À secretaria da pós-graduação e à CPG pela atenção e auxílio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado e também pela bolsa de estágio e pesquisa no exterior, possibilitando a realização desta pesquisa.

A minha irmã, Denise, pelo amor, incentivo e amizade.

Ao meu marido, Hamilton, pelo amor, apoio, ajuda e incentivo na elaboração deste trabalho.

Aos meus amigos da pós-graduação, Orerves, Rodrigo e Diogo que em cada momento foram cruciais na execução do meu doutorado, me ajudando sempre que possível, todas as vezes que precisei.

Aos estagiários do laboratório, Marina Soares, Jéssica Salles e Filipe Dellaqua Soares, que muito me ajudaram na execução dos experimentos.

Ao Grupo de Oração Universitário que frequentei durante esse período que estive em Lorena. Pessoas iluminadas eu pude conhecer lá.

As minhas amigas de Araraquara, que mesmo longe, sempre estiveram presente de certa forma em meu doutorado. Obrigada Ana Lúcia, Mariana, Juliana, e Thais.

A todos os meus professores que colaboraram de certa forma para o meu aprendizado.

E todos aqueles me ajudaram de qualquer forma, e que cuja colaboração foi importante para a conclusão deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

RESUMO

AIZEMBERG, R. **Emprego do caldo de cana e do melado como adjunto de malte de cevada na produção de cervejas.** 2015. 272 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2015.

Parte do malte pode ser substituído por adjuntos, que podem ser à base de cereais, ou de carboidratos de origem vegetal. A cana de açúcar constitui-se de uma matéria prima favorável à fermentação alcoólica por ser rica em carboidratos e micronutrientes, e pode ser utilizada como um adjunto do malte. Estudos de fermentação do mosto com este adjunto, na forma de caldo e de melado de cana, foram realizados na Planta Piloto de Bebidas da EEL-USP, e a partir daí, foram feitas análises físico-química, microbiológicas e sensoriais da cerveja obtida, com diferentes proporções de adjunto. As fermentações foram realizadas inicialmente em escala de bancada (1 L), utilizando mostos preparados com caldo ou melado de cana com ou sem diferentes tratamentos de clarificação, em duas concentrações diferentes (25% e 50% de caldo ou melado), além do mosto puro malte. Análises de concentração e viabilidade celular, pH, consumo de extrato e formação de etanol foram realizadas ao longo das fermentações e, também foi efetuado o cálculo de produtividade e rendimento. Os ensaios sem tratamento do caldo ou melado foram escolhidos para uma produção em uma escala de 5 L, para que análises físico-químicas e sensorial fossem realizadas. A cerveja elaborada com 25% de melado de cana sem tratamento foi a cerveja mais aceita e foi escolhida para a produção em escala piloto (200 L). Análises físico-químicas e de envelhecimento foram realizadas, e essa cerveja também foi avaliada sensorialmente juntamente com duas cervejas de mercado, onde novamente foi declarada como a mais aceita, mostrando que o melado de cana é um adjunto adequado na fabricação de cervejas, mostrando ser um potencial no mercado de bebidas. Finalmente, cervejas com melado de cana foram elaboradas na forma *ale* e *lager* em uma infra-estrutura bem equipada em um laboratório em uma universidade belga.

Palavras-chave: Adjunto, Caldo de cana, Melado, Fermentação alcoólica.

ABSTRACT

AIZEMBERG, R. **Use of sugarcane juice and syrup as adjunct of malted barley in the production of beers.** 2015. 272 p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2015.

Part of malted barley can be replaced by adjuncts, which can be from cereals, or carbohydrates of vegetable origin. Sugarcane is a raw material favorable to the alcoholic fermentation to be rich in carbohydrates and micronutrients, and can be used as a adjunct. The wort fermentation studies with this adjunct in the form of sugarcane juice and sugarcane syrup, were performed in the Beverage Pilot Plant EEL-USP, and from there, it were made physical-chemical, microbiological and sensorial analysis with beers with different proportion of adjuncts. The fermentations were initially carried out in laboratory scale (1 L) prepared with sugarcane juice or sugarcane syrup in different treatments and in two different concentrations (25% and 50%), and also 100% of malt wort. Analysis of cell concentration and viability, pH, extract consumption and ethanol formation were held throughout the fermentations and also calculation of the productivity and yield. Assays with sugarcane juice and syrup without treatment were selected for production on a slightly larger scale (5L) and physico-chemical and sensorial analyzes were performed. Beer made with 25% of sugarcane syrup without treatment was a beer more accepted and it was chosen for the production on a pilot scale (200 L). Physico-chemical and aging analyzes were performed, and that beer was also evaluated by sensory analyzis compared with two beer market, where again it was declared as the most accepted, showing that the sugarcane syrup is a very interesting adjunct in the manufacture of beer, showing a potential in the beverage market. Finally, beers with sugarcane syrupo were prepared in *ale* and *lager* form in a well-equipped infrastructure in a laboratory in a Belgian university.

Keywords: Adjunct, Sugarcane juice, Sugarcane syrup, Alcoholic fermentation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Fluxograma com procedimentos para determinação de coliformes totais, fecais e bactérias heterotróficas.	74
Figura 2 – Perfil de tempo e temperatura no processo de mosturação por infusão.	77
Figura 3 – Fermentadores adaptados com garrafas PET de 2000 mL.	79
Figura 4 – Caldo de cana cru (a); impurezas retidas após a filtração do caldo no procedimento de clarificação parcial (b); caldo de cana após o tratamento de clarificação parcial (c) e comparação do caldo de cana cru (à esquerda) com o caldo submetido ao tratamento da clarificação parcial (direita), ambos concentrados à 65°Brix (d), segundo Prati e Moretti (2002).	89
Figura 5 – Caldo de cana com adição dos reagentes para a clarificação (a); filtração do caldo de cana (b); resíduo da filtração do caldo de cana clarificado (c); comparação do caldo cru (à esquerda) com o caldo submetido ao tratamento da clarificação (d) e caldo de cana concentrados à 65°Brix (e), segundo Consencana (2006).	90
Figura 6 – Concentração de extrato do mosto (°P), em diferentes temperaturas, ao longo do processo de mosturação.	91
Figura 7 – Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (%v/v) e pH durante a fermentação de mosto 100% malte (16°P/12°C) utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PPB01.	96
Figura 8 – Crescimento celular (10^7 células/mL) e viabilidade durante o processo fermentativo em mosto com 16°P, 100% malte, utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PPB01, a 12°C.	97
Figura 9 – Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PPB01, durante a fermentação do mosto com 16°P e 12°C, contendo 100% de malte.	99
Figura 10 – Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (%v/v) e pH durante a fermentação de mosto 100% malte (16°P/12°C) utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PPB02.	100
Figura 11 – Crescimento celular (10^7 células/mL) e viabilidade durante o processo fermentativo em mosto com 16°P, 100% malte, pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PPB02, a 12°C.	101

Figura 12 – Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB02, durante a fermentação do mosto a 16°P e 12°C, contendo 100% de malte.....102

Figura 13 – Concentração de extrato (°P) em função dos tempos de fermentação para Ensaio 1 (melado parcialmente clarificado), Ensaio 2 (melado cru), Ensaio 3 (caldo parcialmente clarificado), Ensaio 4 (caldo cru), na proporção de 75% de malte e 25% de caldo de cana.103

Figura 14 – Concentração de extrato (°P) em função dos tempos de fermentação para Ensaio 5 (melado parcialmente clarificado), Ensaio 6 (melado cru), Ensaio 7 (caldo parcialmente clarificado) e Ensaio 8 (caldo cru), na proporção de 50% de malte e 50% de caldo de cana.104

Figura 15 – Concentração de etanol % (v/v) em função dos tempos de fermentação para Ensaio 1 (melado parcialmente clarificado), Ensaio 2 (melado cru), Ensaio 3 (caldo parcialmente clarificado), Ensaio 4 (caldo cru), na proporção de 75% de malte e 25% de caldo de cana.104

Figura 16 – Concentração de etanol % (v/v) em função dos tempos de fermentação para Ensaio 5 (melado parcialmente clarificado), Ensaio 6 (melado cru), Ensaio 7 (caldo parcialmente clarificado) e Ensaio 8 (caldo cru), na proporção de 50% de malte e 50% de caldo de cana.105

Figura 17 – Grau Aparente de Fermentação (%) em função dos tempos de fermentação para Ensaio 1 (melado parcialmente clarificado), Ensaio 2 (melado cru), Ensaio 3 (caldo parcialmente clarificado), Ensaio 4 (caldo cru), na proporção de 75% de malte e 25% de caldo de cana.106

Figura 18 – Grau Aparente de Fermentação (%) em função dos tempos de fermentação para Ensaio 5 (melado parcialmente clarificado), Ensaio 6 (melado cru), Ensaio 7 (caldo parcialmente clarificado) e Ensaio 8 (caldo cru), na proporção de 50% de malte e 50% de caldo de cana.107

CAPÍTULO 3

Figura 19 – Fermentadores adaptados com galões PET de 6000 mL.132

Figura 20 – Perfil de aminoácido em cerveja 100% malte.145

Figura 21 – Perfil de aminoácidos em cervejas contendo 25% e 50% de caldo de cana...146

Figura 22 – Perfil de aminoácidos em cervejas contendo 25% e 50% de melado de cana.146

Figura 23 – Caracterização dos consumidores em relação ao sexo, à escolaridade, à faixa etária e a frequência de consumo da bebida.....151

Figura 24 – Escores hedônicos para os três grupos de aceitação quanto à cor das cervejas.	152
Figura 25 – Escores hedônicos para os três grupos de aceitação quanto à aparência das cervejas.	153
Figura 26 – Histograma e classificação dos escores hedônicos obtidos para a cor e aparência das cervejas.	154
Figura 27 – Escores hedônicos para os três grupos de aceitação quanto à sabor das cervejas.	156
Figura 28 – Histograma e classificação dos escores hedônicos obtidos para o sabor das cervejas.	157
Figura 29 – Histograma e classificação dos escores hedônicos obtidos para o odor das cervejas.	158
Figura 30 – Histograma e classificação dos escores hedônicos obtidos para a impressão global das cervejas.	160
Figura 31 – ACP das relações da preferência global de 120 consumidores com as 5 cervejas em análise.	161
Figura 32 – Representação gráfica dos resultados do teste de aceitação em relação à atitude de compra.	162

CAPÍTULO 4

Figura 33 – Planta piloto de preparação do mosto e fermentação cervejeira da Escola de Engenharia de Lorena – USP.	173
Figura 34 – Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (% v/v), células (10^7 cel/mL) e pH durante a fermentação de mosto com 75% malte e 25% melado de cana (16°P/12°C) utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PPB01.	183
Figura 35 – Crescimento celular (10^7 células/mL e g/mL) e viabilidade durante o processo fermentativo em mosto com 75% malte e 25% melado de cana (16°P/12°C) utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PPB01.	184
Figura 36 – Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PPB01, durante a fermentação do mosto a 16°P e 12°C, contendo 75% de malte e 25% de melado de cana.	185
Figura 37 – Densidade do mosto com 75% de malte e 25% de melado de cana (16°P/12°C) utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PPB01.	186

Figura 38 – Grau Aparente de fermentação (%) utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PPB01, durante a fermentação do mosto a 16°P e 12°C, contendo 75% de malte e 25% de melado de cana.....	187
Figura 39 – Perfil de aminoácidos em cervejas contendo 25% de melado de cana.....	198
Figura 40 – Caracterização dos consumidores em relação ao gênero, à escolaridade, à faixa etária e ao consumo da bebida.	201
Figura 41 – Perfil dos escores hedônicos para os três grupos de aceitação quanto à cor das cervejas.....	202
Figura 42 – Perfil dos escores hedônicos para os três grupos de aceitação quanto à aparência das cervejas.	203
Figura 43 – Histograma e classificação dos escores hedônicos obtidos para a cor e aparência das cervejas.	204
Figura 44 – Perfil dos escores hedônicos para os três grupos de aceitação quanto ao odor das cervejas.	206
Figura 45 – Histograma e classificação dos escores hedônicos para o odor das cervejas.	206
Figura 46 – Perfil dos escores hedônicos para os três grupos de aceitação quanto ao sabor das cervejas.	208
Figura 47 – Histograma e classificação dos escores hedônicos para o sabor das cervejas.	209
Figura 48 – Histograma e classificação dos escores hedônicos para a impressão global das cervejas.....	210
Figura 49 – ACP da impressão global das cervejas.	211
Figura 50 – Perfil dos escores hedônicos para os três grupos de preferência quanto à impressão global das cervejas.	211
Figura 51 – Mapa de percepção entre grupos de preferência e gênero.....	213
Figura 52 – Mapa de percepção entre grupos de preferência e faixa etária.....	214
Figura 53 – Mapa de percepção entre grupos de preferência e cerveja predileta.	214
Figura 54 – Representação gráfica dos resultados do teste de aceitação em relação à atitude de compra.....	215

CAPÍTULO 5

- Figura 55 – Consumo de extrato durante a fermentação por leveduras ale em um mosto 16°P, contendo diferentes proporções de malte, suplementadas com melado de cana, a 22°C.232
- Figura 56 – Consumo de extrato durante a fermentação por leveduras lager em mosto 16°P, contendo diferentes proporções de malte, suplementadas com melado de cana, a 12°C. .233
- Figura 57 – Conteúdo de FAN durante a fermentação pela levedura ale em mosto 16°P a 22°C, em mosto de malte suplementado com diferentes proporções de melado de cana..234
- Figura 58 – Conteúdo de FAN durante a fermentação pela levedura lager em mosto 16°P a 22°C, em mosto de malte suplementado com diferentes proporções de melado de cana..234
- Figura 59 – Cores finais de cervejas ale com diferentes proporções de mosto de malte, suplementadas com melado de cana.237
- Figura 60 – Cores finais de cervejas lager com diferentes proporções de mosto de malte, suplementadas com melado de cana.238
- Figura 61 – Comparação entre os compostos fenólicos totais em cervejas ale e lager, com diferentes proporções de mosto de malte, suplementadas com melado de cana (Média $\pm$ Desvio Padrão). Diferença significativa na mesma proporção de malte é indicado com * ($\alpha = 0,05$).239
- Figura 62 – Perfil de aminoácidos em cervejas ale com mosto puro malte (100%) e suplementado com 25% de melado de cana.255
- Figura 63 – Perfil de aminoácidos em cervejas lager com mosto puro malte (100%) e suplementado com 25% de melado de cana.255

APÊNDICES

Figura 64 – (A) Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (%v/v), crescimento celular (cel/mL) e pH e (B) Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação de mosto com 16°P e 12°C, contendo 75% de malte e 25% de melado de cana parcialmente clarificado (Ensaio 1 do Capítulo 2).....269

Figura 65 – (A) Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (%v/v), crescimento celular (cel/mL) e pH e (B) Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação de mosto com 16°P e 12°C, contendo 75% de malte e 25% de melado de cana cru (Ensaio 2 do Capítulo 2).....269

Figura 66 – (A) Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (%v/v), crescimento celular (cel/mL) e pH e (B) Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação de mosto com 16°P e 12°C, contendo 75% de malte e 25% de caldo de cana parcialmente clarificado (Ensaio 3 do Capítulo 2).....270

Figura 67 – (A) Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (%v/v), crescimento celular (cel/mL) e pH e (B) Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação de mosto com 16°P e 12°C, contendo 75% de malte e 25% de caldo de cana cru (Ensaio 4 do Capítulo 2).....270

Figura 68 – (A) Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (%v/v), crescimento celular (cel/mL) e pH e (B) Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação de mosto com 16°P e 12°C, contendo 50% de malte e 50% de melado de cana parcialmente clarificado (Ensaio 5 do Capítulo 2).....271

Figura 69 – (A) Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (%v/v), crescimento celular (cel/mL) e pH e (B) Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação de mosto com 16°P e 12°C, contendo 50% de malte e 50% de melado de cana cru (Ensaio 6 do Capítulo 2).....271

Figura 70 – (A) Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (%v/v), crescimento celular (cel/mL) e pH e (B) Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação de mosto com 16°P e 12°C, contendo 50% de malte e 50% de caldo de cana parcialmente clarificado (Ensaio 7 do Capítulo 2).....272

Figura 71 – (A) Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (%v/v), crescimento celular (cel/mL) e pH e (B) Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação de mosto com 16°P e 12°C, contendo 50% de malte e 50% de caldo de cana cru (Ensaio 8 do Capítulo 2).....272

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Composição do caldo de cana de açúcar.....	50
Tabela 2 – Composição nutricional do açúcar refinado e do melado, por 100g dos produtos.	52

CAPÍTULO 2

Tabela 3 – Ensaio preliminares com diferentes condições de experimentos.	76
Tabela 4 – Características físico-químicas da água utilizada na Microcervejaria (DEbiq/EEL) em comparação aos valores sugeridos pela indústria cervejeira, conforme descrito em SENAI (1997).	85
Tabela 5 – Contagem de coliformes totais, fecais e bactérias heterotróficas.	88
Tabela 6 – Valores obtidos após a fermentação de 30 horas de mosto puro malte; 75% malte e 25% caldo de cana e 50% malte e 50% caldo de cana (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PPB01) e mosto puro malte (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PPB02), todos na concentração original de 16°P.....	93
Tabela 7 – Valores de cor para cervejas puro malte e com adição de diferentes proporções de caldo ou melado de cana, sem tratamento e com tratamentos de clarificação.....	94
Tabela 8 – Valores de cor de cervejas comerciais tipo clara.	95
Tabela 9 – Produtividade e rendimento nos respectivos tempos obtidos nos ensaios utilizando mosto 100% malte pelas leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PPB01 e PPB02.	108
Tabela 10 – Produtividade e rendimento nos respectivos tempos obtidos nos Ensaio de 1 a 4.	108
Tabela 11 – Produtividade e rendimento nos respectivos tempos obtidos nos Ensaio de 5 a 8.	109
Tabela 12 – Comparação dos principais fatores da fermentação.....	110
Tabela 13 – Comparação da produtividade volumétrica (g/L.h), rendimento (g/g) e teor de álcool em 96 e 120 horas de fermentação.....	111

CAPÍTULO 3

Tabela 14 – Análises físico-químicas de cervejas puro malte e com adição de caldo ou melado de cana, em diferentes concentrações.	141
Tabela 15 – Concentrações de açúcares em cervejas puro malte e com adição de caldo ou melado de cana.....	142
Tabela 16 – Concentrações de ésteres e álcoois superiores em cervejas puro malte e com adição de caldo ou melado de cana.	143
Tabela 17 – Concentrações de aldeídos em cervejas puro malte e com adição de caldo ou melado de cana.....	144
Tabela 18 – Compostos fenólicos totais (TPC) e atividade antioxidante pelos radicais DPPH e ABTS.	148
Tabela 19 – Compostos fenólicos totais (TPC) e atividade antioxidante pelos radicais DPPH e ABTS de cervejas comerciais.	149
Tabela 20 – Escores hedônicos médios para os três grupos de aceitação quanto ao atributo cor da cerveja.	152
Tabela 21 – Escores hedônicos médios para os três grupos de aceitação quanto ao atributo aparência da cerveja.	153
Tabela 22 – Escores hedônicos médios para os três grupos de aceitação quanto ao atributo sabor das cervejas.....	156
Tabela 23 – Escores hedônicos médios para o atributo odor das cervejas.	158
Tabela 24 – Escores hedônicos médios para o atributo impressão global das cervejas.....	159

CAPÍTULO 4

Tabela 25 – Caracterização da cerveja de melado de cana após diluição e comparação com cerveja puro malte.....	188
Tabela 26 – Caracterização da cerveja com melado de cana após diluição e comparação com cerveja de banana e cervejas do mercado.	190
Tabela 27 – Concentrações de açúcares em cerveja de melado.....	191
Tabela 28 – Concentrações de ésteres e álcoois superiores em cerveja de melado fresca e envelhecida (9meses/22°C) e em cerveja puro malte fresca.....	192

Tabela 29 – Seleção dos álcoois superiores e ésteres estudados com seus descritores de sabor e limiares organolépticos.....	194
Tabela 30 – Concentrações de aldeídos em cerveja de melado fresca e envelhecida (9meses/22°C) e em cerveja puro malte fresca.....	195
Tabela 31 – Seleção dos aldeídos estudados e seus descritores de sabor (BAERT et al., 2012).	196
Tabela 32 – Concentrações de ácidos orgânicos em cerveja de melado de cana.	199
Tabela 33 – Escores hedônicos médios para os três grupos de aceitação quanto ao atributo cor da cerveja.	202
Tabela 34 – Escores hedônicos médios para os três grupos de aceitação quanto ao atributo aparência da cerveja.	203
Tabela 35 – Escores hedônicos médios para os três grupos de aceitação quanto ao atributo odor da cerveja.	205
Tabela 36 – Escores hedônicos médios para os três grupos de aceitação quanto ao atributo sabor da cerveja.	207
Tabela 37 – Escores hedônicos médios para os três grupos de aceitação quanto à impressão global das cervejas.	209
Tabela 38 – Análise Geral dos grupos de preferência por atributo.	212

CAPÍTULO 5

Tabela 39 – Dados de cervejas ale após maturação (2 semanas, 0 ° C).	236
Tabela 40 – Dados de cervejas lager após maturação (2 semanas, 0 ° C).	237
Tabela 41 – Atividade antioxidante de cervejas ale e lager com diferentes proporções de mosto de malte, suplementadas com melado de cana (Média ± Desvio Padrão). Diferença significativa na mesma linha é indicado com * ($\alpha = 0,05$).	240
Tabela 42 – Análises de cervejas ale (16°P), com diferentes proporções de mosto de malte, suplementadas com melado de cana (Média ± Desvio Padrão).	243
Tabela 43 – Análises de cervejas lager (16°P), com diferentes proporções de mosto de malte, suplementadas com melado de cana (Média ± Desvio Padrão).	244
Tabela 44 – Análises das diferntes cervejas ale e lager, com ou sem adição de melado de cana (Média ± Desvio Padrão). Mesmas letras na mesma fileira significa que não houve diferença significativa ao nível de significância de 5% no teste de Tukey.	247

Tabela 45 – Análises “padrão” de diferentes cervejas frescas e envelhecidas, do tipo ale e lager, com ou sem adição de melado de cana (Média ± Desvio Padrão). Mesmas letras na mesma fileira significa que não houve diferença significativa ao nível de significância de 5% no teste de Tukey.	248
Tabela 46 – Concentração de ésteres em cervejas ale e lager frescas e envelhecidas, com ou sem adição de melado de cana.	250
Tabela 47 – Concentração de álcoois superiores em cervejas ale e lager frescas e envelhecidas, com ou sem adição de melado de cana.....	251
Tabela 48 – Concentração de aldeídos em cervejas ale e lager frescas e envelhecidas, com ou sem adição de melado de cana.	253
Tabela 49 – Média dos escores globais de envelhecimento das cervejas envelhecidas. ...	257

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACP: Análise de componente principal

Cel/mL: células por mililitro

DP: desvio padrão

EBC: European Brewery Convention

EEL: Escola de Engenharia de Lorena

FAN: conteúdo de nitrogênio livre

GAF: grau aparente de fermentação

hL: hectolitro

IBU: *International bitterness units* (unidade internacional de amargor)

PET: politereftalato de etileno

TEAC: atividade antioxidante equivalente ao Trolox

TRAP: potencial antioxidante reativo total

UFC: unidade formadora de colônia

UNT: Unidade nefalométrica de turbidez

USP: Universidade de São Paulo

VHG: *Very high gravity*

$Y_{P/S}$: fator de conversão de substrato em produto

°P: graus Plato

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO	29
2. OBJETIVOS	31
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	32
3.1. Cerveja.....	32
3.2. Matérias primas	33
3.2.1. Malte de cevada	33
3.2.2. Água.....	36
3.2.3. Lúpulo	37
3.2.4. Leveduras	39
3.2.5. Micro-organismos contaminantes	41
3.2.6. Adjuntos	43
3.3. Processamento de elaboração da cerveja.....	46
3.4. Cana de açúcar.....	47
3.4.1. Melado e sua produção	51
3.5. Metabolismo das leveduras	53
3.6. Processos <i>high-gravity</i>	55
3.7. Envelhecimento de cervejas	56
REFERÊNCIAS.....	58

CAPÍTULO 2 – QUALIDADE DA ÁGUA CERVEJEIRA E ESTUDO DO PROCESSO FERMENTATIVO DE CERVEJAS PURO MALTE E COM ADIÇÃO DE CALDO OU MELADO DE CANA

1. INTRODUÇÃO	70
2. MATERIAL E MÉTODOS	72
2.1. Material	72
2.1.1. Água.....	72
2.1.2. Malte de cevada	72
2.1.3. Lúpulo	72
2.1.4. Leveduras	72
2.1.5. Cana de açúcar	73
2.1.6. Melado de cana	73

2.2.	Métodos.....	73
2.2.1.	Análise da água.....	73
2.2.2.	Obtenção do caldo de cana	74
2.2.3.	Moagem do malte	76
2.2.4.	Mosturação.....	76
2.2.5.	Filtração/Clarificação do mosto.....	77
2.2.6.	Fervura do mosto	78
2.2.7.	Preparação do inóculo.....	78
2.2.8.	Fermentação	79
2.2.9.	Maturação	79
2.2.10.	Teste de atenuação limite.....	80
2.2.11.	Avaliação da cor das cervejas finais	81
2.2.12.	Acompanhamento analítico dos experimentos	81
2.2.13.	Contagem de células	82
2.2.14.	Análise dos Resultados	82
3.	RESULTADOS	85
3.1.	Análise da água	85
3.2.	Clarificação do caldo de cana	88
3.3.	Acompanhamento da concentração do mosto na etapa de mosturação	90
3.4.	Atenuação limite – Grau de fermentação final do mosto.....	92
3.5.	Cor das cervejas	94
3.6.	Estudo de fermentações de mostos com 100% malte	95
3.6.1.	Fermentação de mosto puro malte pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PPB01	96
3.6.2.	Fermentação de mosto puro malte pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PPB02	99
3.7.	Estudo de fermentações de mostos com caldo de cana ou melado como adjunto	102
3.8.	Produtividade volumétrica em etanol (Qp) e rendimento em etanol (Y _{p/s}) dos ensaios	107
4.	CONCLUSÕES	116
	REFERÊNCIAS.....	117
CAPÍTULO 3 – ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL DE CERVEJAS COM ADIÇÃO DE CALDO OU MELADO DE CANA		
1.	INTRODUÇÃO	123
1.1.	Componentes presentes na cerveja.....	124

1.2.	Compostos fenólicos e atividade antioxidante	125
1.3.	Análise sensorial.....	126
2.	MATERIAL E MÉTODOS	128
2.1.	Material	128
2.2.	Métodos	128
2.2.1.	Obtenção do caldo e do melado de cana	128
2.2.2.	Elaboração das cervejas	129
2.2.3.	Moagem do malte.....	129
2.2.4.	Mosturação.....	129
2.2.5.	Filtração/Clarificação do mosto	129
2.2.6.	Fervura do mosto	130
2.2.7.	Resfriamento do mosto	130
2.2.8.	Preparação do inóculo.....	130
2.2.9.	Fermentação	131
2.2.10.	Maturação.....	132
2.2.11.	Engarrafamento	132
2.2.12.	Análises físico-químicas	133
2.2.13.	Determinação de açúcares.....	133
2.2.14.	Determinação de ésteres e álcoois superiores	134
2.2.15.	Determinação de aldeídos	134
2.2.16.	Determinação de diacetil.....	135
2.2.17.	Determinação do perfil de aminoácidos.....	135
2.2.18.	Compostos fenólicos	136
2.2.19.	Atividade antioxidante	136
2.2.20.	Análise sensorial	137
2.3.	Análise dos resultados	138
3.	RESULTADOS.....	140
3.1.	Análises físico-químicas.....	140
3.1.1.	Determinação de açúcares.....	141
3.1.2.	Determinação de ésteres e álcoois superiores	142
3.1.3.	Determinação de aldeídos	143
3.1.4.	Determinação de aminoácidos	145
3.2.	Compostos fenólicos e atividade antioxidante	147
3.3.	Análise sensorial.....	151
3.3.1.	Análise da aceitação dos atributos cor e aparência	151
3.3.2.	Análise da aceitação do atributo sabor.....	155

3.3.3.	Análise da aceitação do atributo odor	157
3.3.4.	Análise da impressão global das cervejas	159
3.3.5.	Teste de atitude de compra	161
4.	CONCLUSÕES	163
	REFERÊNCIAS.....	164
CAPÍTULO 4 – PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ANÁLISE SENSORIAL DE CERVEJA COM 25% DE MELADO DE CANA		
1.	INTRODUÇÃO	171
2.	MATERIAL E MÉTODOS	172
4.1.	Material	172
4.2.	Métodos.....	172
4.2.1.	Preparação do mosto	172
4.2.2.	Moagem do malte	173
4.2.3.	Mosturação.....	173
4.2.4.	Filtração do mosto	174
4.2.5.	Fervura do mosto	174
4.2.6.	Preparação do meio de cultivo e pré-inóculo.....	174
4.2.7.	Fermentação	175
4.2.8.	Maturação	175
4.2.9.	Filtração	175
4.2.10.	Engarrafamento e pasteurização	175
4.2.11.	Análises realizadas durante a fermentação	176
4.2.12.	Análises físico-químicas da cerveja.....	177
4.2.13.	Determinação de açúcares	177
4.2.14.	Determinação de ésteres e álcoois superiores	178
4.2.15.	Determinação de aldeídos	179
4.2.16.	Determinação do perfil de aminoácidos	179
4.2.17.	Análise sensorial	180
4.2.18.	Análise dos resultados	181
5.	RESULTADOS	183
5.1.	Fermentação pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PPB01	183
5.2.	Análises físico-químicas	187
5.3.	Determinação de açúcares.....	190
5.4.	Determinação de ésteres e álcoois superiores	191

5.5.	Determinação de aldeídos	195
5.6.	Determinação de aminoácidos.....	198
5.7.	Determinação de ácidos orgânicos	199
5.8.	Análise sensorial.....	200
5.8.1.	Análise da aceitação dos atributos cor e aparência	201
5.8.2.	Análise da aceitação do atributo odor	205
5.8.4.	Análise da impressão global das cervejas	209
5.8.5.	Análise Geral.....	212
5.8.6.	Análise da relação das preferências com as características do perfil do consumidor	212
5.8.7.	Teste de atitude de compra.....	215
6.	CONCLUSÕES	216

REFERÊNCIAS	217
-------------------	-----

CAPÍTULO 5 – USO DE MELADO DE CANA COMO ADJUNTO NA PRODUÇÃO DE CERVEJAS *LAGER* E ALE

1.	INTRODUÇÃO	222
2.	MATERIAL E MÉTODOS	224
2.1.	Ensaio de fermentação em pequena escala	224
2.2.	Ensaio de cerveja em escala piloto (50 L)	225
2.3.	Análises	227
2.3.1.	Análises “padrão” das cervejas	227
2.3.2.	Determinação de açúcares.....	227
2.3.3.	Determinação de aldeídos	228
2.3.4.	Determinação de ésteres e álcoois superiores	228
2.3.5.	Determinação de iso- α -ácidos.....	229
2.3.6.	Determinação do perfil de aminoácidos.....	229
2.3.7.	Determinação de diacetil.....	230
2.3.8.	Avaliação sensorial de cervejas envelhecidas.....	231
2.4.	Análise estatística dos resultados	231
3.	RESULTADOS.....	232
3.1.	Ensaio de fermentação em pequena escala	232
3.2.	Ensaio em escala piloto (50 L)	245
3.3.	Avaliação sensorial das cervejas envelhecidas	256
4.	CONCLUSÕES	258

REFERÊNCIAS.....	259
APÊNDICES	264
APÊNDICE A – Modelo do questionário a ser aplicado aos consumidores antes do teste de aceitabilidade.	264
APÊNDICE B – Modelo do TCLE aplicado aos consumidores antes do teste de aceitabilidade.	265
APÊNDICE C – Ficha de avaliação sensorial	268
APÊNDICE D – Gráficos da cinética de mostos elaborados com caldo ou melado de cana..	269

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

Biotecnologia é a aplicação da Bioquímica, da Biologia, da Microbiologia e da Engenharia Química aos processos e produtos industriais. A produção de cerveja, devido à sua longa história, é geralmente mencionada como um exemplo típico da biotecnologia clássica. Entretanto, a cervejaria moderna aplica uma ampla gama de inovações técnicas, bioquímicas, microbiológicas e genéticas (CARVALHO; BENTO; SILVA, 2006).

A cerveja é uma bebida milenar originária da cultura Mediterrânea clássica, vinculada desde a antiguidade para fins terapêuticos. As primeiras referências históricas existem há mais de 6.000 anos, e demonstram que a cerveja por ser uma bebida fermentada, era consumida pela civilização com o objetivo de evitar enfermidades infecciosas adquiridas ao beber água não higienizada (FREITAS et al., 2006).

O Brasil é o terceiro maior mercado do mundo, com produção anual de 12,6 bilhões de litros, atrás somente de China e Estados Unidos. O bom momento da economia estimula o consumo de cerveja no país sendo que o cultivo de cevada tem aumentado e o lúpulo começa a ser produzido no país (E-NEWS CERVESIA, 2011).

A cerveja é uma bebida carbonatada de teor alcoólico entre 3 e 8% (v/v), preparada a partir de malte de cevada, lúpulo, fermento e água de boa qualidade, sendo ainda permitido o uso de outras matérias primas (SILVA, 2005a).

Parte do malte de cevada pode ser substituída por outros cereais, maltados ou não, como arroz, milho, trigo, aveia, centeio ou sorgo. No entanto, para ser denominada cerveja, é necessário que a bebida possua proporção de malte de cevada maior ou igual a 50%, em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares (SIQUEIRA; BOLINI; MACEDO, 2008).

As grandes empresas cervejeiras apostam num produto massificado, com qualidade assegurada, porém de baixo preço, já as microcervejarias tem como principal foco, consumidores que procuram por cervejas diferenciadas e de alta qualidade. O propósito dos empresários que atuam neste setor é encontrar um nicho de mercado, com um produto diferente em sabor, aroma, *flavor*, cor e teor alcoólico, onde os clientes estejam dispostos a pagar um preço diferenciado por esse produto (KALNIN, 1999).

Essas microcervejarias oferecem ao mercado produtos diferenciados, onde a variedade e a qualidade muitas vezes surpreendem, e, além disso, não concorrem diretamente com as grandes cervejarias, pelo fato de serem geralmente associadas à gastronomia e produzirem as bebidas para serem consumidas no próprio local.

A escolha do desenvolvimento de uma cerveja com caldo ou melado de cana decorre da necessidade de criar um novo produto. Com esse novo produto, os pequenos produtores de cana de açúcar terão uma alternativa a mais para a utilização de sua safra, agregando maior valor a matéria prima produzida direcionando seu plantio para essa finalidade.

Além disso, a cana de açúcar é uma matéria prima abundante no Brasil e está disponível para ser utilizada como adjunto cervejeiro.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de produção de cervejas utilizando caldo ou melado de cana como adjunto.

Objetivos específicos

- Avaliação de tratamentos de clarificação do caldo de cana e do melado como adjuntos e análise da cor das cervejas obtidas;
- Estudo do processo fermentativo de cervejas com 100; 75 e 50% de malte, em mostos complementados com 0; 25 e 50% de caldo de cana ou com melado;
- Determinação da proporção de malte e adjunto que mais agradou o consumidor por meio da análise sensorial;
- Análises físico-químicas de cervejas com adição de caldo ou melado de cana;
- Produção em escala piloto da cerveja com 25% de melado; caracterização físico-química e análise sensorial da bebida comparada com cervejas do mercado;
- Produção e composição físico-química de cervejas *lager* e *ale* com uso de 25% melado de cana.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.Cerveja

Segundo a Instrução Normativa nº 054 (IN-054), publicada em 2001, que estabelece padrões de identidade e qualidade dos produtos de cervejaria, a cerveja é definida como a bebida resultante da fermentação do mosto de malte de cevada ou seu extrato, submetido previamente a um processo de cocção, adicionado de lúpulo. A fermentação deve ocorrer mediante a presença de levedura cervejeira e uma parte do malte ou do seu extrato poderá ser substituída por adjuntos cervejeiros (BRASIL, 2001).

Nas últimas décadas, com o aumento do consumo de cerveja no Brasil e em outros países, tem se observado uma significativa evolução dos conhecimentos científicos nesta área, tais como, o profundo entendimento da fisiologia celular, técnicas de imobilização da levedura cervejeira, fermentação e maturação em sistemas contínuos e criação de novas linhagens de leveduras com a chegada da genética molecular. Tudo isto vem beneficiando o avanço e controle do processo cervejeiro. No Brasil, duas tendências têm se destacado: a obtenção de cervejas a partir de mostos concentrados (*High Gravity Brewing*) e a elaboração de cervejas utilizando adjuntos especiais (MATOS et al., 2009).

Como resultado da crescente competitividade do mercado, tanto para a redução de custos como para a introdução de novos produtos, os cervejeiros estão constantemente buscando inovações tecnológicas para seus processos (DRAGONE; MUSSATTO; SILVA, 2007).

A produção e o consumo de cervejas no Brasil são caracterizados pela presença de poucas marcas de quase que um único tipo de cerveja, no caso, a do tipo *lager* Pilsener (Pilsen), sendo que outros tipos apresentam um consumo restrito, principalmente por consumidores mais exigentes em termos de qualidade sensorial, que buscam um produto diferenciado, independentemente do preço. A baixa diversidade de cervejas brasileiras contrasta com o modelo de outros países, onde se observa uma grande variedade de marcas e tipos de cervejas, com sabores, coloração e amargor distintos (SILVA; FARIA, 2008).

A cerveja Pilsen, de coloração clara, sabor delicado e baixo teor alcoólico corresponde a 98% de toda a cerveja consumida no Brasil (SINDICERV, 2012). As diversas marcas de cerveja Pilsen do mercado brasileiro tem sabor muito parecido e o principal instrumento de diferenciação desses produtos para a população passa a ser a

imagem subjetiva frente aos consumidores por meio da divulgação na mídia (MATTOS, 2007).

As principais cervejarias brasileiras quando procuram atender diferentes nichos de mercado, buscam fazer através do recurso do produto Premium, que é lançado no mercado como sendo do tipo “extra” ou “especial”. Com relação à produção, as cervejas Premium se diferenciam pela utilização de matérias primas de melhor qualidade (CASTRO, 1997).

3.2. Matérias primas

3.2.1. Malte de cevada

A fabricação de bebidas alcoólicas foi iniciada há pelo menos 5.000 anos pelos egípcios, e é evidente que, desde o início, dependia-se de grãos de cereais como matéria prima principal. Na fabricação da cerveja moderna, contudo, a cevada adquiriu uma internacional aceitação como o grão de escolha, devido a algumas qualidades inerentes especiais que tem, e também devido às extensas pesquisas, o que resultou numa melhoria considerável da qualidade das cervejas (AGU; PALMER, 1998).

A cevada é o cereal mais adequado para este processo, devido à sua composição química, características físicas e seu conteúdo ideal de amilases que se desenvolvem durante a germinação. Essas enzimas são de vital importância para o processo cervejeiros (CEPPI; BRENNAN, 2010).

A cevada é uma gramínea do gênero *Hordeum* e sua cultura é realizada em climas temperados. No Brasil é produzida em algumas partes do Rio Grande do Sul durante o inverno, e na América do Sul, a Argentina é a grande produtora (CARVALHO et al., 2009).

Várias razões indicam a cevada como cereal a ser utilizado no processamento de elaboração do malte e da cerveja: (1) a cevada possui um alto teor de amido, em equilíbrio com seu teor de proteínas. Ao mesmo tempo, são equilibrados os aspectos importantes da cerveja, como corpo, a espuma e a estabilidade coloidal, (2) a parte externa permanece no grão após a debulhagem da colheita mecanizada até o malte pronto, devendo ser preservada, sobretudo durante a moagem, considerando sua importância para o processo de clarificação do mosto nas tinas de mostura e (3) a existência de enzimas pré-formadas e

outras que irão se formar durante a malteação, durante o processo de sua transformação em malte, e que irá auxiliar no processo de mosturação (TSCHOPE, 2001).

Na cevada os grãos na espiga podem estar alinhados em duas ou seis fileiras, porém, essa diferença não é apenas morfológica. A cevada de seis fileiras, quando comparada com a de duas, apresenta menor teor de amido, maior riqueza protéica ou especificamente, enzimática. Seus grãos são menos uniformes e possuem mais cascas. Assim sendo, a cevada de seis fileiras deve apresentar alguma dificuldade na produção do malte e na moagem dos grãos na cervejaria, menor rendimento na mosturação, mas, por outro lado, facilita a filtração do mosto e aceita maior proporção de adjunto na formulação da cerveja. Os Estados Unidos usam preferencialmente o malte de cevada de seis fileiras, tanto em cervejaria como nas destilarias de uísque, enquanto que a de duas fileiras é utilizada na produção de cerveja europeia. No Brasil, a cevada cervejeira produzida nos estados do sul apresenta duas fileiras (VENTURINI FILHO; CEREDA, 2001).

Embora vários cereais possam ser satisfatoriamente maltados, a cevada é a que apresenta menores dificuldades técnicas no processo de maltagem. Por exemplo, o milho apresenta problemas de ranço na fração lipídica; o trigo, durante a maltagem, sofre ação de micro-organismos que crescem na superfície do grão e a cevada, apresenta alto teor de amido, o que vai gerar mais extrato fermentável. A proteína encontra-se em quantidade e qualidade suficiente para a nutrição das leveduras durante a fermentação, assim como para a formação de espuma no produto final. A cevada maltada confere sabor, odor e corpo característico normalmente agradável à cerveja (CEREDA; VENTURINI FILHO, 2005).

A cevada passa por um processo de malteação, com controle de umidade, temperatura e aeração a fim de iniciar sua germinação. Nesta etapa, o endosperma da cevada é transformado internamente através de uma ação citolítica promovida por enzimas denominadas hemicelulases, que liberam o amido, até então envolvido em células de paredes enrijecidas por hemiceluloses, substâncias gomosas e proteínas. Durante a germinação são desenvolvidas as importantes enzimas do malte (TSCHOPE, 2001).

O processo de maltagem é constituído por três etapas: maceração, germinação e secagem. A maceração prepara o grão para a etapa de germinação. O grão, com valores de umidade na ordem de 12 – 14 %, é posto em contato com água, durante cerca de dois dias em grandes tanques de fundo cônico, aumentando seu teor de umidade até cerca de 42%. O ar é introduzido e o oxigênio é consumido, enquanto o gás carbônico é formado (CRUZ, 2007).

A germinação é um processo biológico que torna as paredes celulares do grão bem quebradiças e facilita a extração do amido. Na sua estrutura existem duas grandes zonas: o embrião e a endosperma. O embrião vai ser sede de ordens hormonais que desencadeiam as reações que levam à degradação enzimática parcial do amido armazenado no endosperma, originando açúcares. Estes vão ser a fonte indispensável de energia para o crescimento da pequena raiz (radícula) e do pequeno caule (caulículo) em formação. Durante a germinação são sintetizadas as enzimas hidrolíticas, necessárias à hidrólise parcial dos componentes da cevada (amido, proteínas, paredes celulares), que dão origem aos nutrientes requeridos pela levedura. É também na germinação que as proteínas de reserva do grão são hidrolisadas e utilizadas para sintetizar outras proteínas para o desenvolvimento do embrião. Os aminoácidos do mosto vão ser também formados parcialmente nesta fase embora a maior quantidade venha se originar na mosturação (CRUZ, 2007).

Na etapa da secagem, quando o tamanho do caulículo atinge um comprimento que se situa em torno de 75% do grão, a germinação e a desagregação são interrompidas por secagem controlada, conseguida por uma corrente de ar quente. Segue-se uma fase de aquecimento, até, pelo menos 80°C, em estufa, que vai dar a coloração do malte e o seu sabor peculiar, apropriado a cada tipo de cerveja. A atividade enzimática cessa totalmente embora continue presente quando a umidade do grão baixa para menos de 5 % (CRUZ, 2007).

Maltes escuros são definidos como maltes curados a temperaturas mais altas do que o malte pilsen e, raramente são utilizados em níveis superiores a 5%, pois podem ter um impacto significativo nas características finais de produto, porém, contribuem para cor e sabor de vários estilos de cerveja (COGHE et al., 2003).

Durante o tratamento térmico para obter maltes mais escuros, ocorre a reação de Maillard, entre açúcares redutores e aminoácidos, o que vai reduzir esses nutrientes e afetar a fermentação, pois as leveduras utilizam esses nutrientes (carboidratos e aminoácidos) para o seu crescimento e produção de energia. Uma vez que o metabolismo de aminoácidos da levedura está intimamente associado com a formação de álcoois, ésteres e dicetonas vicinais; baixos níveis de aminoácidos pode afetar substancialmente a geração destes importantes compostos de sabor (COGHE et al., 2005).

3.2.2. Água

A água é um dos principais fatores a ser levado em consideração na fabricação de cervejas, pois é o meio indispensável a todas as reações químicas e bioquímicas formadoras da cerveja. É a principal matéria prima em termos de quantidade, visto que 92 a 95% do peso da cerveja é constituído de água (SILVA, 2005).

A água utilizada na indústria cervejeira, de captações municipais ou próprias, é aquela adequada a alimentação humana, podendo ser ajustada nas fábricas devido às diversas exigências da mosturação (com pH na faixa onde as enzimas do malte atuam para a transformação do amido em açúcares fermentáveis; promover a extração das moléculas amargas e aromáticas do lúpulo, bem como uma boa coagulação do material mucilaginoso conhecido como *trub*, durante a fervura), filtrações, fermentação (permitir uma fermentação asséptica) e acondicionamento (desenvolver cor e *flavor* característicos do tipo de cerveja a ser fabricada). Dessa forma, a água usada na cervejaria deve ser insípida e inodora para não interferir na qualidade da cerveja acabada (CRUZ, 2007).

A água contém íons dissolvidos, e os mais relevantes para fins cervejeiros são cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e bicarbonato (HCO_3^-). Os dois primeiros representam dureza e o último, alcalinidade. Em geral, a dureza é desejável para fins de fabricação de cerveja, já a alcalinidade não (LEWIS, 2004).

Na natureza toda água contém sais dissolvidos em quantidades e qualidades de modo diferenciado de acordo com sua região. Se a quantidade for alta a água passa a ter um sabor conforme os sais nela dissolvidos. Além disso, as águas naturais podem possuir matérias orgânicas e compostos gasosos que, além do sabor, transmitam-lhes odor. Deste modo, a quantidade e a qualidade dos sais dissolvidos e dos compostos orgânicos presentes na água, influenciam nos processos químicos e enzimáticos que ocorrem durante a fermentação e, conseqüentemente, na qualidade da cerveja produzida (VARNAM; SUTHERLAND, 1997).

No entanto, se a água não for de boa qualidade ou não apresentar composição química adequada, poderá ser tratada por diferentes processos visando purificá-la e, se necessário, efetuar algumas modificações nos níveis de íons inorgânicos apresentados (VARNAM; SUTHERLAND, 1997).

O tratamento da água pode ser tão simples como a adição de ácido para neutralizar a alcalinidade para o nível necessário, ou fervendo a água dura, que tende a quebrar o íon

de bicarbonato precipitando na forma de carbonato de cálcio, uma reação familiar para aqueles que vivem em muitas áreas de água dura (LEWIS, 2004).

Os grandes centros cervejeiros da Europa desenvolveram-se onde a água disponível era apropriada para a produção de tipos específicos de cerveja. Atualmente, a tecnologia de tratamento de águas evoluiu de tal forma que, teoricamente, é possível adequar a composição de qualquer água às características desejadas devido a técnicas como a deionização e osmose reversa. É dito teoricamente, porque o custo de alterar a composição salina da água normalmente é muito alto, motivo pelo qual as cervejarias ainda hoje consideram a qualidade da água disponível como fator determinante da localização de suas fábricas (CARVALHO, 2009).

A osmose reversa é um tratamento moderno, em que a água é forçada a alta pressão através uma membrana. A água pura passa através da membrana e os íons dissolvidos não (LEWIS, 2004).

No Brasil, a maioria das regiões dispõe de águas suaves e adequadas à produção de cervejas do tipo *lager*, denominação genérica do tipo de cerveja clara e suave que é produzida no país (CARVALHO, 2009).

3.2.3. Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta têxtil típica de regiões frias dos EUA, Alemanha, República Tcheca, Polônia, Austrália, Nova Zelândia, Japão, China, Chile, Argentina e outros. É uma planta perene e produtiva por 20 a 30 anos, de raízes profundas, que necessita de inverno longo para uma boa produtividade. Além disso, sendo uma planta dióica (com os dois sexos separados), só as plantas femininas não fecundadas são de interesse cervejeiro (TSCHOPE, 2001).

São vigorosas trepadeiras e crescem em cordas de 4-6 metros sobre uma treliça; possuem os chamados “cones” que são o fruto da videira, embora muitas vezes incorretamente chamado de “flor”. Cada cone é aproximadamente do tamanho do topo de um polegar humano, é verde e estruturado como uma pequena alcachofra de brácteas sobrepostas. Na base de cada bráctea há um pó amarelo que são as glândulas de lupulina que contêm os óleos essenciais, com potencial para dar aromas à cerveja e são mais valorizados em alguns tipos de lúpulo, chamados lúpulos de aroma (LEWIS, 2004).

A plantação se dá, preferencialmente, em vales ou encostas para diminuir o impacto dos ventos, que podem causar despetalamento e, assim, diminuir seu valor cervejeiro, já que os grânulos de lupulina estão ali encerrados (TSCHOPE, 2001).

O lúpulo contém α -ácidos, moléculas altamente desejáveis como a principal fonte de amargor, e a principal medida de valor e qualidade; β -ácidos, de pouco valor, embora possam oxidar para se obter os compostos amargos e, as chamadas resinas duras (LEWIS, 2004).

O lúpulo pode ser comercializado na forma de “flores” secas *in natura*, *pellets* ou em extratos, podendo tradicionalmente ser classificado como lúpulos aromáticos e de amargor conforme suas características predominantes (SEIDL, 2003).

Como regra geral, o amargor afeta negativamente a detecção de alimentos (ROY, 1992), no entanto, os princípios amargos do lúpulo tem um papel essencial no sabor da cerveja (COLLIN; DERDELINCKX; DUFOUR, 1994).

A variedade de lúpulo parece ser um fator determinante a este respeito e influencia principalmente as quantidades relativas de humulona, cohumulona, adhumulona, prehumulona e poshumulona, conhecidos como precursores de substâncias de gosto amargo nas cervejas (AITKEN et al, 1970; VERZELE; DE KEUKELEIRE, 1991).

Os α -ácidos ou humulonas são insolúveis, mas isomerizam-se parcialmente durante a etapa da fervura, levando a compostos solúveis, os iso- α -ácidos ou iso-humulonas, que são responsáveis pelo principal amargor da cerveja (TSCHOPE, 2001).

O amargor dos iso- α -ácidos é comparável com o de sulfato de quinina enquanto a cafeína é relatada como sendo mais do que 20 vezes menos amarga. A capacidade de criar um teor estável e agradável na cerveja continua a ser um dos maiores desafios na arte da cervejaria (COLLIN; DERDELINCKX; DUFOUR, 1994).

Além de aroma e amargor, o lúpulo apresenta ação antisséptica, pois os iso- α -ácidos são bacteriostáticos e também contribuem para a estabilidade do sabor e da espuma da cerveja (VENTURINI FILHO; CEREDA, 2001). Os iso- α -ácidos hidrogenados ou reduzidos apresentam propriedades ainda mais interessantes, tais como a resistência à luz (PUSECKER; ALBERT; BAYER, 1999).

Durante séculos, acreditava-se que o lúpulo protegia a cerveja de deterioração, porém, estudos de suas propriedades antibacterianas demonstraram que a sua adição pode inibir o crescimento de bactérias Gram positivas, mas não afeta o crescimento de Gram negativas. Certos compostos de lúpulo, principalmente os iso- α -ácidos possuem atividade antibacteriana dirigido contra bactérias Gram-positivas, e estas propriedades

antimicrobianas podem ser exploradas para aumentar a estabilidade microbiológica da cerveja por adição controlada de compostos do lúpulo (VAUGHAN; O'SULLIVAN; SINDEREN, 2005).

Além do amargor dado à cerveja, o lúpulo está ligado a benefícios para a saúde e, de acordo com Vanhoecke et al. (2005), possui um tipo de flavonóide, o xanto-humol, produzido nas glândulas de lupulina. Estudos demonstraram um papel promissor para o xanto-humol como um agente quimiopreventivo, pois pode modular o metabolismo carcinogênico.

3.2.4. Leveduras

Na primeira manifestação da lei de pureza alemã (*Reinheitsgebot*), em 1516, que ditou os ingredientes aceitáveis na cerveja – malte, água e exclusivo uso de lúpulo – a levedura não foi incluída como um ingrediente, pois a sua natureza e importância eram desconhecidas. Com o trabalho de Pasteur a partir de 1876 e estudos sobre cultura pura de células, a importância das leveduras para a fermentação de cerveja começou a ser identificada. Dessa forma, as leveduras cervejeiras não eram apenas um ingrediente, mas um agente ativo na fermentação, tornando-se um dos maiores contribuintes para uma fermentação bem sucedida e produzindo uma cerveja de boa qualidade (PIDDOCKE; OLSSON, 2009).

As leveduras são micro-organismos eucariontes, unicelulares, desprovidos de clorofila e podem ser encontrados em quase todo o lugar no ambiente. A habilidade de converter açúcares em etanol é característica de um pequeno grupo de micro-organismos, sendo *Saccharomyces cerevisiae*, a que mais se destaca pela alta produção e tolerância a concentrações mais altas de etanol (SHWAN; CASTRO, 2001).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é tipicamente gemulante e suas cepas são utilizadas no processo de fermentação para a produção de bebidas alcoólicas e combustíveis como etanol, são em geral de forma elipsoidal, com dimensões características de 6 a 8 µm de comprimento por 5 µm de diâmetro (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1996).

Reproduzem-se assexuadamente por brotamento e durante o processo, o núcleo se divide por “estrangulamento” onde uma parte dele entra no broto juntamente com outras organelas. A conexão citoplasmática é lacrada pela síntese de novo material de parede celular. Observa-se tanto o estado vegetativo haploide como os diploides podem estar

presentes. A cariogamia precede um estágio de multiplicação vegetativa diploide e a meiose precede um estágio de multiplicação vegetativa haploide com formação de ascósporos (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1996).

O metabolismo das leveduras pode ser tanto respiratório quanto fermentativo, dependendo da presença ou ausência de oxigênio. Quando na presença de oxigênio, a levedura tende a respirar, metabolizando a glicose pela via glicolítica e, posteriormente, oxidando o ácido pirúvico resultante pela via do ácido cítrico, gerando como subprodutos, CO₂, água e energia suficiente para que a célula sobreviva e se divida. Em anaerobiose, a célula metaboliza a glicose pela via glicolítica e oxida os produtos pela via fermentativa alcoólica, gerando etanol, CO₂ e energia o suficiente para sua sobrevivência (SANTOS, 2011).

O oxigênio é essencial para o crescimento da levedura, visto que é utilizado na fase respiratória, ou seja, antes de iniciar a fermentação e, por isso, é um fator limitante. As leveduras utilizam oxigênio para a síntese de esteróis, que são utilizados para manutenção das paredes celulares flexíveis e importantes para o crescimento celular. Antes do início da fermentação, o mosto deve ser aerado para promover o crescimento de levedura (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Nos últimos 30 anos, novas cepas de leveduras foram desenvolvidas para atender às necessidades de diferentes tipos de mostos cervejeiros. Empresas concentraram-se em encontrar novos produtos e processos mais eficientes, assim como desenvolver cepas de leveduras capazes de degradar dextrinas não fermentáveis em açúcares fermentescíveis e produzir um sabor agradável em uma cerveja com baixo teor de carboidratos. Buscam também melhorar ainda mais o desempenho da fermentação através do aumento das taxas de atenuação, um melhor controle da produção metabólitos de sabor, tais como os ésteres, elevados teores de álcoois, e de compostos de enxofre e, aumentar a produção de etanol e da osmotolerância para fermentações de mostos com elevada densidade (*high gravity*) (PIDDOCKE; OLSSON, 2009).

Em 1883, Emil C. Hansen do laboratório Carlsberg descobriu um método para a utilização de culturas de células isoladas de levedura na produção de cerveja. Isto levou a uma revolução na produção de cerveja porque, pela primeira vez, tornou-se possível o uso de uma cultura pura de levedura. A primeira cultura pura de cerveja do tipo *lager* foi nomeada de cepa de baixa fermentação e depois nomeada de *Saccharomyces carlsbergensis*. Atualmente, a maior parte das cepas de levedura de cerveja *lager* são

descententes próximos desta linhagem (HANSEN; KIELLAND-BRANDT; DE WINDE, 2003).

Dependendo de suas características morfológicas, as leveduras cervejeiras são divididas em dois grupos: as de alta fermentação e as de baixa fermentação. Leveduras de alta fermentação são estreitamente relacionadas com as linhagens laboratoriais de *S. cerevisiae* e são usadas para a produção de cerveja do tipo *ale* em temperaturas mais elevadas (20 a 25°C) (HANSEN; KIELLAND-BRANDT; 1997; DEQUIM, 2001).

As leveduras de baixa fermentação foram inicialmente denominadas como *S. carlsbergensis*, e mais tarde renomeado como *Saccharomyces pastorianus*. Essas leveduras são usadas para a produção de cerveja *lager* com menores temperaturas de fermentação (entre 7 e 15°C). Embora a produção de cerveja *ale* tenha um menor ou nenhum tempo de maturação, toda produção de cerveja *lager* requer um tempo de maturação de pelo menos algumas semanas (KODAMA; KIELLAND-BRANDT; HANSEN, 2005).

A taxonomia das cepas de levedura *lager* passaram por várias alterações ao longo dos anos. Inicialmente, elas foram incluídas como uma parte do taxon *S. cerevisiae*, mas depois foram classificadas como uma parte do grupo de *S. pastorianus* considerado uma espécie híbrida poliplóide de *S. cerevisiae* e outras espécies intimamente relacionados à *Saccharomyces* (HANSEN; KIELLAND-BRANDT; DE WINDE, 2003).

Taxonomistas de leveduras passaram a classificar todas as cepas empregadas na produção de cerveja como *Saccharomyces cerevisiae*, referindo-se às leveduras simplesmente como *S. cerevisiae* tipo *ale* ou tipo *lager* (SILVA, 2005).

3.2.5. Micro-organismos contaminantes

A cerveja tem sido reconhecida como uma bebida microbiologicamente estável; e isto é devido à presença de etanol (0,5-10% p/p), compostos amargos do lúpulo (17-55 mg/L de iso- α -ácidos), elevado teor de dióxido de carbono (cerca de 0,5% p/v), pH baixo (3,8-4,7) e concentração reduzida de oxigênio (geralmente menor do que 0,3 mg/L) (SUZUKI et al., 2006).

No entanto, o mosto é diferente da cerveja, pois ele é rico em nutrientes, tem pH entre 5,3-5,5 e contém oxigênio, constituindo um meio de crescimento adequado para muitos micro-organismos (MATTOS, 2004).

Embora a cerveja seja um produto microbiologicamente estável, micro-organismos indesejados podem provocar a deterioração durante a malteação e processos cervejeiros.

Isso afeta negativamente a qualidade da cerveja, com consequências prejudiciais e financeiras para a indústria cervejeira (VAUGHAN; O'SULLIVAN; SINDEREN, 2005).

A cerveja também é um meio pobre porque os nutrientes são quase esgotados pela fermentação das leveduras, porém, apesar destas características bastante hostis, alguns micro-organismos são capazes de crescer. Entre os micro-organismos de deterioração de cerveja, quatro gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* e *Megasphaera*, são considerados como particularmente prejudiciais para cervejas em termos de frequências de incidentes de deterioração e efeitos negativos sobre o perfil de sabor das cervejas (SUZUKI, 2011).

A cerveja pode conter contaminantes microbianos originários a partir de uma variedade de fontes. Contaminantes primários provêm das matérias primas e dos recipientes e, contaminantes secundários são introduzidos para a cerveja durante o engarrafamento, armazenamento ou preenchimento de barris. Cerca de metade dos problemas microbiológicos documentados podem ser atribuídos a contaminações secundárias, porém, as consequências das contaminações primárias podem ser mais catastróficas com a perda potencial da bebida (VAUGHAN; O'SULLIVAN; SINDEREN, 2005).

As bactérias lácticas são micro-organismos Gram positivos e geralmente são considerados como micro-organismos bons e são usados em uma grande variedade de alimentos fermentados, tais como iogurtes e pickles, no entanto, na indústria de produção de cerveja, esses micro-organismos são os principais responsáveis por 60-90% da deterioração da cerveja, pois essas bactérias apresentam resistência aos ácidos amargos do lúpulo (SUZUKI, 2011).

As bactérias lácticas são comumente encontradas na cerveja por sua tolerância à acidez e por serem microaerófilas. O desenvolvimento de *Lactobacillus* está sempre associado à queda no pH da cerveja (produção de ácido láctico) e à formação de turbidez; a presença das células é facilmente visível ao microscópio e, eventualmente, diacetil também é produzido. A presença de *Pediococcus* é facilmente identificada de duas maneiras: ao microscópio, visualizando-se os cocos organizados em “tétradas”, quatro células juntas, e por detecção do *flavor* referente ao diacetil (MATTOS, 2004).

A microbiota da cevada pode ter um impacto negativo sobre a qualidade do mosto e dependerá tanto das condições de colheita como de pós-colheita. Espécies de *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum* e *Fusarium* são exemplos de fungos. *Fusarium* é um dos

gêneros de fitopatogênico mais importantes, causando perdas para a agricultura, além de causar redução da qualidade dos grãos (VAUGHAN; O'SULLIVAN; SINDEREN, 2005).

Fungos das espécies *Aspergillus* e *Penicillium* podem crescer durante o armazenamento da cevada, e produzir toxinas chamadas de aflatoxinas (HIFNAWY et al., 2004).

3.2.6. Adjuntos

Os adjuntos na produção de cerveja podem ser definidos como qualquer fonte de carboidrato diferente do malte de cevada que contribui com açúcares fermentescíveis ao mosto (STEWART, 2000). A utilização desses adjuntos é permitida por lei em vários países, e são vários os tipos de matérias primas e aditivos autorizados (ENGLMANN; MIEDANER, 2005).

O malte de cevada pode ser parcialmente substituído por grãos adjuvantes, tais como milho e arroz. Açúcares, diferentes melados, misturas contendo amido, e diferentes tipos de adjuntos também podem ser adicionados na cerveja (SOHRABVANDI et al., 2010).

Quando se tratarem de açúcares não provenientes de cereais, a quantidade empregada em relação ao extrato primitivo de cevada maltada é limitada conforme o tipo de cerveja produzida e, seu emprego não poderá ser superior a 45% em relação ao extrato primitivo (BRASIL, 2001).

Pollock (1979) cita que o uso de adjuntos pode proporcionar melhor estabilidade físico-química à cerveja, reduzindo-lhe a turvação. Lewis e Young (1995), complementam que o uso de adjuntos pode tornar a cerveja mais clara e de sabor e aroma mais delicado, haja vista a redução das concentrações de sólidos solúveis do malte.

Para Briggs et al. (2004) os adjuntos amiláceos podem ser separados em três classes: aqueles que podem ser misturados sem pré-cozimento, como a farinha de trigo, aqueles que necessitam de pré-cozimento antes do início da mosturação, como o floco de milho, e por fim aqueles que obrigatoriamente passam por um processo de cozimento como parte do programa de mosturação, tais como; griz de milho, arroz e sorgo.

Para Cereda (1983), qualquer planta que contenha amido, teoricamente, pode ser utilizada como complemento; se for cereal, não deverá ser maltado. Para a escolha de um adjunto deve-se levar em consideração, o valor econômico, disponibilidade e teor de amido. Existem vários estudos acerca de novos adjuntos de malte para a indústria

cervejeira. A motivação para tais estudos é movido por diversos aspectos como produção excedente de material amiláceo, normalmente fruto de uma demanda regional, reaproveitamento de sub-produtos, novos cultivares e etc.

Grandes números de compostos derivados das matérias primas e do próprio processo de produção contribuem com o sabor e aroma da cerveja, cujos efeitos são considerados positivos desde que estejam presentes de maneira equilibrada, uma vez que a quantidade de cada composto na cerveja pode determinar sua aceitação ou rejeição pelos consumidores (SILVA et al., 2009).

Adjuntos são utilizados principalmente por fornecerem extrato a um baixo custo, ou seja, como uma fonte barata de carboidratos comparada ao fornecido pelo malte, e por serem altamente disponíveis para as leveduras (BOTELHO, 2009).

Cervejas com adjunto em sua composição são mais leves, atendendo melhor às necessidades do mercado consumidor brasileiro. Cada empresa define a proporção de malte e adjunto em seus produtos conforme lhe convém, seguindo uma tendência mundial de aumento de adjuntos por parte das cervejarias. Entretanto, seu uso abusivo poderia resultar em cerveja pouco encorpada e com má qualidade de espuma (SLEIMAN, 2006).

São vários os adjuntos que podem ser utilizados no processo cervejeiro, dentre os quais, os mais empregados estão o milho, o arroz e o açúcar de cana. Destes, talvez o milho seja o principal deles, a partir do qual se produz o melado de maltose, considerado o adjunto mais utilizado pela indústria cervejeira nacional (VENTURINI FILHO, 2000).

Em vários países, a substituição parcial do malte por adjuntos na fabricação de cervejas é permitida por lei, sendo vários os tipos de matérias primas autorizadas (ENGLMANN; MIEDANER, 2005). Os adjuntos apresentam menores custos de produção em relação ao malte (VENTURINI FILHO, 2000), e os adjuntos líquidos, entre os quais, o principal é o melado de maltose de milho, possuem preços competitivos (SLEIMAN et al., 2010).

O uso do adjunto na cerveja resulta em um produto com alta estabilidade física, melhor resistência ao resfriamento e maior brilho. A maior estabilidade física se deve ao fato de que os adjuntos contribuem muito pouco com material proteico para o mosto e a cerveja, o que é vantajoso em termos de estabilidade coloidal. Adjuntos à base de arroz e milho praticamente não contribuem com proteínas solúveis para o mosto, enquanto outros adjuntos, como cevada ou trigo possuem altos teores de proteínas solúveis (BOTELHO, 2009).

Segundo Silva (2005a), quando se utiliza adjuntos na forma de açúcares, como cristais ou melados concentrados, há vantagens sobre os cereais, como por exemplo, baixos teores de proteínas, não precisar de pré-tratamento (sacarificação) e menores volumes de armazenamento, devido à sua maior concentração. Entretanto, altas concentrações de glicose podem causar efeito de inibição denominado de fermentação lenta ou fermentação por arraste. No entanto, com o avanço da tecnologia de processos enzimáticos, foi possível obter melados de maltose derivados de milho contendo determinados perfis de carboidratos, como por exemplo, o melado com alto teor de maltose, ou ainda a maltose de cereais na forma cristalina. Estes novos produtos permitiram a introdução de adjuntos, sem alterar o perfil de carboidratos do mosto e, conseqüentemente, evitaram maiores dificuldades na sala de preparação de mosto, na fermentação e maturação.

A utilização de fécula de mandioca e amido de milho para a fabricação de hidrolisados de uso cervejeiro resultou em adjuntos com características químicas semelhantes e adequadas para a sua utilização como matéria prima cervejeira, podendo ser considerada matéria prima potencial para a produção de melado de maltose (VENTURINI FILHO; CEREDA, 1998).

Na Itália, em cervejas do tipo *lager*, o milho é extensivamente utilizado como adjunto de cerveja, uma vez que é a principal matéria prima localmente disponível, sendo que pode substituir o malte de cevada até o máximo de 40% em base de extrato seco de acordo com o regulamento italiano GURI (FUMI et al., 2011).

Na Nigéria, um estudo foi conduzido dando ênfase na utilização de cereais locais como o painço e o sorgo para a produção de cerveja tipo *lager* além do milho não maltado, embora com auxílio de enzimas externas (AGU, 1995).

Tanto na Iugoslávia como na maioria dos outros países do mundo, a cerveja é feita com a adição de adjuntos, e o principal é o milho, refinado ou em “grits”, sendo que na última década, a cevada não maltada também foi utilizada. As quantidades e os tipos de adjuntos não são restritos legalmente, e as cervejarias adicionam até 40% de amido de milho ou na forma de grão, normalmente com adição de enzimas comerciais, mas em alguns casos a conversão é realizada apenas com as enzimas do próprio malte (GRUJIC, 1999).

A principal razão para a elevada proporção de adjuntos utilizados é a economia, já que adjuntos amiláceos são normalmente mais baratos que o malte. Na Iugoslávia uma das principais razões para o uso de adjuntos era quantidade insuficiente de malte disponível no mercado nacional, assim como na inadequada capacidade das cervejarias nas épocas de

pico de consumo no verão, o que resultou no uso de elevadas proporções de açúcar como adjunto, principalmente a sacarose (GRUJIC, 1999).

3.3. Processamento de elaboração da cerveja

O processo tradicional de produção de cervejas pode ser resumido em poucas etapas. Na primeira delas, denominada mosturação, o malte moído é misturado com água. As enzimas presentes no próprio malte são então ativadas de acordo com um perfil de temperatura controlado, o qual permite hidrolisar o amido em mono, di, trissacarídeos e dextrinas, e as proteínas em peptídeos e aminoácidos. Essa fase do processo necessita de um tempo de aproximadamente 2 horas para ser completada. Após esse tempo, a fração insolúvel do malte (bagaço de malte) é removida por filtração, obtendo-se uma solução denominada mosto (CARVALHO, 2009).

A próxima etapa consiste na adição de lúpulo e cozimento do mosto durante 1 a 2 horas para assegurar a assepsia necessária do meio, promover a precipitação de compostos complexos formados com proteínas e polifenóis, solubilizar e isomerizar componentes do lúpulo, remover compostos responsáveis por sabores desagradáveis no produto final, inativar as enzimas presentes e permitir a obtenção da concentração desejada de extrato. Ao final do cozimento, o precipitado formado é removido e o mosto é resfriado até a temperatura de fermentação, aerado e inoculado na linha de transferência para o fermentador (LINKO et al., 1998).

A etapa inicial de fermentação do mosto, denominada fermentação primária ou principal, é a fase de maior atividade metabólica da levedura, durante a qual quase todo o extrato fermentescível é convertido em álcool e gás carbônico. Durante este período ocorrem também algumas reações que resultam na formação de subprodutos, tais como ésteres, álcoois superiores e outros, que exercem um importante efeito no sabor da cerveja. Em função das baixas temperaturas utilizadas (6 a 15°C) durante essa fase, a fermentação primária pode durar até 10 dias (LINKO et al., 1998).

A produção industrial convencional de cerveja baseia-se em uma fermentação descontínua do mosto, sem agitação. Um perfil de temperatura ao longo do tempo de fermentação é aplicado a fim de se obter uma quantidade desejada de etanol, e de outras características como aroma, sabor, etc. (ANDREÂS-TOROA et al., 1998).

A etapa seguinte corresponde ao período de maturação da cerveja, ou também chamada de fermentação secundária, onde a temperatura é reduzida normalmente a 0°C

sendo mantida durante 2 a 4 semanas. Caso haja presença de extrato fermentescível residual na cerveja, este continua a ser fermentado nessas condições, porém de forma mais lenta (LINKO et al., 1998).

Há várias estratégias para maturar a cerveja, mas de uma maneira geral, a função da maturação é reduzir a concentração de compostos de sabor indesejáveis, tais como diacetil e acetaldeído, e flocular a levedura, além de aprisionar o CO₂ para carbonatar a cerveja (LEWIS, 2004).

Os processos de maturação são demorados e relativamente caros, porque a cervejaria deve ter muitos sistemas refrigerados para conter a cerveja, que são, no entanto, necessários para obter um produto de qualidade (LEWIS, 2004).

A cerveja antes de ser acondicionada é filtrada normalmente com auxílio de terra de diatomáceas devidamente calcinadas e com teor controlado de ferro, que preenche o filtro, para a remoção de partículas, tais como complexos de proteína - polifenol e leveduras residuais. A filtração confere à cerveja uma melhor estabilidade microbiológica, coloidal e organoléptica, deixando-a clara e brilhante (SANTOS, 2009).

Um importante processo após a filtração e antes da embalagem é o ajuste de dióxido de carbono, até cerca de 5 g/L. O CO₂ não só contribui para aumento da espuma, mas também desempenha um papel importante no prolongamento do prazo de validade da cerveja (SANTOS, 2009).

A etapa final da produção de cerveja é o envase, podendo a cerveja ser acondicionada em diferentes embalagens como garrafa, lata ou barril. Antes ou após o enchimento, dependendo da embalagem, é necessário proceder à estabilização microbiológica da cerveja pela pasteurização. A cerveja em garrafa/lata é pasteurizada unidade a unidade (pasteurização em túnel) durante 15 minutos a 62°C. Se a cerveja for acondicionada em barril é previamente pasteurizada em linha durante 30 segundos a 75°C usando permutador tubular (pasteurização *flash*), sendo a seguir acondicionada nos barris (CRUZ, 2007; GOLDAMMER, 2008).

3.4. Cana de açúcar

A cana de açúcar, planta da ordem Ciperaleas, família *Gramineae* (*Poacea*), gênero *Saccharum*, espécie *Saccharum officinarum*, pertencente à classe das monocotiledôneas das quais se inclui o milho, o sorgo, o arroz e muitas outras gramíneas, é originária da Ásia

Meridional e, é muito cultivada em países tropicais e subtropicais, para obtenção do açúcar, do álcool e da aguardente, devido ao elevado conteúdo de sacarose contido em seu caule (SILVA et al., 2002; SCULACCIO, 2002).

Em função das condições climáticas, no Brasil tem-se duas épocas de colheita e moagem de cana de açúcar. No chamado Norte Açucareiro (estados da região Nordeste), a safra inicia-se em agosto/setembro e vai até março/abril. No Sul Açucareiro (estados produtores do centro-sul) a safra inicia-se em maio e se estende até novembro/dezembro. Nesses períodos a cana encontra-se completamente madura (BRAGA, 2006).

No decorrer do ciclo de crescimento e desenvolvimento, a cana de açúcar atravessa dois períodos distintos com relação ao teor de sacarose: o primeiro é assinalado por um intenso crescimento vegetativo acompanhado por uma gradual formação de sacarose, enquanto, no segundo, ocorre um predominante acúmulo de sacarose, motivado pela escassez dos principais fatores de desenvolvimento vegetativo, como temperatura e água disponíveis (MAGALHÃES, 1987; LUCHESI, 1995).

A primeira fase dos processos fisiológicos da cana de açúcar é a síntese de açúcares e sua translocação, que termina quando ocorre queda da folha; a segunda envolve todos os processos relacionados com o acúmulo de açúcares nos entrenós expandidos. Nesse período crucial (primeiros meses de idade da cana), análises de tecido mostraram altos conteúdos de nitrogênio e água, níveis elevados de enzimas, de auxinas e ácido giberélico endógeno no meristema do tecido de armazenamento imaturo, muita sacarose invertida e numerosos compostos intermediários da fotossíntese e respiração (RODRIGUES, 1995).

Na segunda fase dos processos fisiológicos da planta, a atividade respiratória é alta, há rápida absorção e transpiração de água, com absorção e circulação de nutrientes. A sacarose é rapidamente sintetizada e estocada e, com igual rapidez, retirada do armazenamento para ser metabolizada para a formação dos tecidos novos da planta. (RODRIGUES, 1995).

Fernandes (1982) definiu a maturação da cana de açúcar como sendo um processo fisiológico que envolve a síntese dos açúcares nas folhas, translocação dos produtos formados e estocagem da sacarose no colmo. Assim sendo, a maturação é um processo fisiológico afetado por vários fatores naturais, como a própria variedade, condições climáticas, tipo de solo e tratos culturais.

As variedades de cana de açúcar têm comportamentos distintos, apresentando níveis diferentes de sacarose mesmo quando cultivada nas mesmas condições (NUNES JR., 1987).

A lavoura da cana de açúcar foi a primeira a ser instalada no Brasil, ainda na primeira metade do século XVI, tendo seu cultivo ampliado da faixa litorânea para o interior. No Brasil, a cana constitui-se como matéria prima básica para as agroindústrias do açúcar, do álcool etílico, das aguardentes, e por último o biocombustível, além da utilização de outros subprodutos, como o bagaço depois da extração do caldo, utilizado para produção de eletricidade e também, aproveitado como bagaço hidrolisado, juntamente com a levedura da cana (resíduo da fermentação) em rações para a alimentação de bovinos. A vinhaça ou vinhoto também pode ser usado como adubo (CESAR; SILVA, 1993; STUPIELLO, 1987; SACHS; MARTINS, 2007).

A composição química média da cana madura é a seguinte: água 74,5%, açúcares 14,0%, fibras 10,0%, cinzas 0,50%, ceras 0,20%, substâncias nitrogenadas 0,4%, pectina 0,20%, ácidos combinados 0,12%, ácidos livres 0,08%. No caldo, a água está numa proporção variável de 75,0 a 82,0% e os sólidos entre 18,0 - 25,0% (SOCCOL; SCHWAB; KATAOKA, 1990). Maiores detalhes mostrados na Tabela 1.

Segundo Stupiello (1987), o caldo de cana é constituído basicamente por água (80%) e sólidos totais dissolvidos (20%), destacando-se entre estes, os açúcares tais como a sacarose (17%), glicose (0,4%) e frutose (0,2%) e os compostos orgânicos constituídos por substâncias nitrogenadas, gorduras, ceras, pectinas, ácidos orgânicos e matérias corantes e os compostos inorgânicos, representados pelas cinzas.

A partir da sua prensagem, obtém-se o caldo de cana ou garapa, que é um alimento altamente energético por possuir em sua composição ferro, cálcio, potássio, sódio, magnésio, vitaminas C e do complexo B e uma grande quantidade de carboidratos (CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

O caldo de cana, por conter quantidade variável de nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta atividade de água, pH variando entre 5,0 e 5,5 e temperatura de 25 a 30°C, constitui-se em um ótimo substrato para o crescimento de uma grande diversidade microbiana (GALLO; CANHOS, 1991).

O caldo é uma bebida caracterizada como um líquido opaco, de coloração que varia de parda a verde escuro, e viscoso. Sua composição é variável em função da variedade, idade e sanidade da cana, solo, condições climáticas e planejamento agrícola, conservando todos os nutrientes existentes na cana de açúcar que lhe deu origem (DELGADO et al., 1975).

A cor do caldo resulta da presença de diversas substâncias, como clorofila, antocianinas, xantofilas e carotenos. A sua opacidade é causada por coloides, proteínas,

pentosanas e sais como fosfatos, óxidos de cálcio, ferro e magnésio. Contém, ainda, terra, bagacilho e goma (FIORAVANTI, 2000; KITOKO; OLIVEIRA; SILVA, 2004; ERNANDES, 2006).

Há uma série de compostos coloridos no caldo de cana como clorofila e compostos fenólicos e, uma das alterações mais importantes que ocorre logo após a extração é o seu escurecimento, relacionado com a formação de melanoidinas, provenientes da reação de Maillard entre açúcares redutores e aminoácidos presentes na cana. Outras reações adversas estão relacionadas com a degradação térmica e reações de condensação de açúcares (caramelização), degradação alcalina e reação de condensação de açúcares redutores e reações oxidativas de compostos fenólicos em quinonas, quimicamente mais reativas (BUCHELI; ROBINSON, 1994; DELGADO; CESAR, 1977; QUDSIEH et al., 2002).

Tabela 1 – Composição do caldo de cana de açúcar.

Composição centesimal do caldo de cana			
Elementos (%)		Porcentagem dos componentes	
Água	74,50	Silica (SiO ₂)	0,25
Cinzas	0,50	Potássio (K ₂ O)	0,12
Fibras	10,0	Sódio (Na ₂ O)	0,01
Matérias nitrogenadas	0,40	Cálcio (Ca ₂ O)	0,02
Nitrogênio total	0,06	Magnésio (MgO)	0,01
		Ferro (Fe ₂ O ₃)	traços
		Fósforo (P ₂ O ₅)	0,07
		Sulfatos (SO ₃)	0,02
		Cloretos (Cl)	traços
		Celulose	5,50
		Sacarose	12,50
		Ácido aspártico	0,20
		Acido nítrico	0,01
		Amoníaco	traços
		Corpos xânticos	traços

Fonte: Soccol et al., 1990.

Praticamente qualquer produto natural ou seus derivados de natureza orgânica, como produtos ou subprodutos da agricultura e do processamento de vegetais, podem constituir a base ou substrato para processos fermentativos (JEREZ, 1993).

Dada à importância dos carboidratos no metabolismo de qualquer via celular, não é por acaso que eles são as principais matérias primas nas fermentações. Devem estar presentes compostos nitrogenados, além de fatores de crescimento, como vitaminas e coenzimas. Também é indispensável a presença de fósforo, sob a forma de fosfatos, o qual costuma ser adicionado aos meios, onde exerce ação tamponante ou inibidora de flutuações de pH (TANO; BUZATO, 2003).

3.4.1. Melado e sua produção

O melado é definido pela ANVISA (2005) como “produto obtido pela concentração do caldo de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) ou a partir da rapadura derretida”. Deve ser produzido com matérias-primas não fermentadas, isentas de matéria terrosa, parasitos e detritos de origem vegetal ou animal; também é proibida a adição de aditivos químicos, tais como corantes, essências, conservantes e edulcorantes.

O melado é diferente do melaço, pois o melaço é um produto obtido como resíduo da fabricação do açúcar cristalizado, do melado ou da refinação do açúcar bruto. No Brasil, o melaço é normalmente destinado à alimentação animal ou é fermentado e destilado para produção de álcool (FAGUNDES, 2010).

O melado é um alimento doce, de cor escura, com textura semelhante à do mel, podendo ser utilizado de diversas maneiras na alimentação humana (BAYMA, 1978; PINTO; COELHO, 1983; SEBRAE, 2004).

A partir do melado, são fabricados a rapadura e o açúcar mascavo. Estes produtos, pelo seu modo de fabricação, preservam os nutrientes da cana, podendo ser considerados superiores a outros adoçantes por apresentarem, além do elevado teor de açúcares, vitaminas e minerais (VALMORBIDA; ZARPELLON; BRAGA, 1993).

Alguns derivados da cana-de-açúcar, como a rapadura, o açúcar mascavo e o melado, são considerados alimentos puros, por serem produzidos sem aditivos químicos. Além disso, preservam os nutrientes da cana, apresentando valor nutricional superior ao açúcar refinado, o qual se caracteriza apenas pelo seu poder adoçante e energético

(VALMORBIDA; ZARPELLON; BRAGA, 1993). A Tabela 2 apresenta a comparação da composição nutricional do melado e do açúcar refinado.

Tabela 2 – Composição nutricional do açúcar refinado e do melado, por 100g dos produtos.

Nutriente	Açúcar refinado	Melado
Energia (Kcal)	387	296
Carboidrato (g)	99,5	76,6
Proteína (g)	Tr	0
Lipídeo (g)	Tr	0
Fibra (g)	0	0
Cálcio (mg)	4	102
Ferro (g)	0,1	5,4
Magnésio (mg)	1	115
Manganês (mg)	-	2,62
Fósforo (mg)	Tr	74
Potássio (mg)	6	395

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO, 2006.

Para a produção do melado, a cana pode ser cortada até uma semana antes do dia da fabricação, pois o caldo com maior acidez previne a cristalização da sacarose. A cana colhida deve ser mantida em local onde não receba sol ou chuva, para não haver perdas, resultando em menor rendimento e dificuldades de obtenção do ponto do melado (VALMORBIDA; ZARPELLON; BRAGA, 1993).

Após a colheita, os colmos da cana devem passar por um processo de limpeza, a fim de se eliminar as sujidades, como barro, palha e ceras. A ponta e as folhas da cana também devem ser aparadas, pois estas contêm substâncias amargas (enzimas), maior acidez, fibras, água e menor teor de açúcar, o que confere ao produto final um sabor menos agradável (GOBATO et al., 2002; BRAGANÇA, 2007).

Para obtenção do caldo, os colmos devem ser esmagados em uma moenda bem ajustada para possibilitar um melhor rendimento, em uma base de 500 litros de caldo para uma tonelada de cana-de-açúcar (SEBRAE, 2004). O caldo extraído deve ser peneirado para a retirada das impurezas grosseiras (bagacilhos). O caldo peneirado então é aquecido até a temperatura de 70° C, adicionando-se de 0,4 a 0,75 g de ácido cítrico por litro de caldo para evitar a cristalização da sacarose. Em seguida, o caldo é colocado em repouso

por 30 minutos para que ocorra a decantação das impurezas, sendo que neste momento pode-se adicionar 0,2 a 0,4 g de cal por litro de caldo, a fim de melhorar a sua purificação.

Após este processo, o caldo é colocado em tachos de ferro ou cobre para ser aquecido em fornalhas de tijolo. Antes do início da fervura, outras impurezas que emergem do caldo devem ser removidas com o auxílio de uma escumadeira. Esta etapa é fundamental para a obtenção de um produto final de qualidade, de coloração adequada e livre de impurezas no fundo da embalagem. Com a evaporação da água do caldo, o volume diminui e o caldo vai ficando mais concentrado. Desta forma, deve-se trabalhar o produto com uma pá apropriada, mexendo até atingir o ponto, evitando que o melado queime. Quando o caldo engrossa, para de subir no tacho e forma um melado denso e viscoso, obtém-se o ponto de melado. Outra maneira de determinar o ponto do melado é utilizando um refratômetro, de modo que o ponto é atingido quando o caldo concentrado apresentar de 65 a 74° Brix, ou seja, uma concentração de 650 a 740g de sólidos solúveis por quilograma de melado. O melado então deve ser resfriado à temperatura próxima de 90° C e envasado em frascos de vidro ou plástico, com fechamento hermético. Um melado de qualidade não deve apresentar cristais, nem sinais de fermentação (FAGUNDES, 2010).

3.5. Metabolismo das leveduras

As células de levedura apresentam necessidades nutricionais durante o processo de fermentação alcoólica, influenciando diretamente na multiplicação e no crescimento celular e também na eficiência da transformação de açúcar em álcool (RIBEIRO; LOPES; FERRARI, 1987).

O açúcar que se encontra no mosto é utilizado pela levedura para a produção de etanol, gás carbônico, massa celular, ácidos succínico e acético, glicerol, álcoois superiores, ésteres, aldeídos, entre outros produtos (BRAGA, 2006).

De acordo com Briggs et al. (2004), a levedura possui mecanismos que dão preferência para assimilação de carboidratos prontamente assimilados, no caso, monossacarídeos e posteriormente dissacarídeos e oligossacarídeos.

O extrato do mosto é composto de carboidratos fermentáveis, proteínas, dextrinas e cinzas, sendo que em torno de 80% é fermentável. Os açúcares podem ser classificados de acordo com sua fermentabilidade em: (1) monossacarídeos que são fermentados diretamente pela levedura (frutose e glicose); (2) açúcares que são dissociados pelas enzimas hidrolases em açúcares diretamente fermentáveis (sacarose, maltose, maltotriose)

e (3) açúcares que não são dissociados pela levedura (não são fermentáveis, como as dextrinas e polissacarídeos) (REINOLD, 1997).

Os mostos obtidos apenas a partir de malte, além de dextrinas, contêm como principal fonte de carbono os seguintes açúcares: glicose, maltose e maltotriose. Em situação normal, leveduras cervejeiras são capazes de utilizar glicose, frutose, maltose e maltotriose, nesta sequência, embora algum grau de sobreposição aconteça, sendo que as dextrinas somente são utilizadas por *Saccharomyces diastaticus* (SILVA, 2005).

Os açúcares fermentáveis contribuem diretamente para a doçura de cerveja, enquanto que os carboidratos maiores podem ser benéficos para a percepção de cerveja, já que contribuem para o corpo ou a sensação na boca (NOGUEIRA et al., 2005).

A principal fonte de nitrogênio existente no mosto para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes nitrogenados, é a variedade de aminoácidos formados a partir da hidrólise das proteínas do malte ocorrida durante o processo de mosturação. O mosto obtido desse processo contém 19 aminoácidos, os quais, em condições fermentativas, são consumidos pelas leveduras de uma maneira ordenada, sendo diferentes aminoácidos assimilados em vários estágios do ciclo fermentativo (RUSSEL, 1994).

O nitrogênio é considerado um elemento essencial para a multiplicação e crescimento das leveduras. Este nutriente entra como constituinte de várias substâncias orgânicas encontradas nas leveduras, como os aminoácidos, proteínas, enzimas, pirimidinas, purinas, pigmentos respiratórios (citocromos), lecitinas, vitaminas e cefalina (WHITE, 1954).

O oxigênio fornecido na aeração do mosto antes da inoculação é consumido pela levedura geralmente em poucas horas e utilizado para produzir ácidos carboxílicos insaturados e esteróis que são essenciais para a síntese da membrana celular e, conseqüentemente, para o crescimento da célula. Este fenômeno ficaria restrito na ausência deste oxigênio inicial, causando fermentação anormal e mudanças nas características sensoriais da cerveja. No entanto, somente no início do processo fermentativo o oxigênio é benéfico; em qualquer outra etapa do processo é promove instabilidade do produto final (SILVA, 2005).

3.6. Processos *high-gravity*

A tecnologia utilizando mosto com elevadas concentrações de açúcares, também denominado de alta densidade (*high gravity brewing*), consiste no preparo de um mosto com uma concentração de açúcares maior do que a normalmente utilizada e que, conseqüentemente, produz maior teor de álcool e requer uma diluição em uma etapa posterior (STEWART; RUSSEL, 1985).

É possível realizar a mosturação com altas concentrações de matéria prima e depois diluir durante a clarificação ou, ainda, após a fervura do mosto. Existem métodos em que se trabalha com altas concentrações até o final da maturação, e a diluição da cerveja ocorre só no final do processo (TSCHOPE, 2001).

Devido à redução na quantidade de água, pode-se aumentar a produção da cervejaria sem necessidade de expandir as instalações no que se refere à sala de preparo do mosto, tanques de fermentação e de armazenamento (STEWART; RUSSEL, 1985). A execução dos processos *high gravity* resultam em alta economia de energia e ocupação de espaço de equipamentos, tendo em vista que, com o mesmo equipamento disponível, é possível aumentar a produção de uma fábrica, podendo chegar a 25 - 30% (TSCHOPE, 2001).

Em cervejarias tradicionais, mostos com concentração de 11 a 12°P são fermentados para produzir cervejas contendo de 3 a 5% (p/v) de álcool. As cervejas obtidas com mostos de elevadas concentrações de açúcares, geralmente até o limite de 14 a 16°P, tem sido utilizadas propiciando vantagens de aumento de eficiência das instalações, reduções no consumo de energia, no tempo de trabalho e nos custos, melhora do aroma e sabor, maior estabilidade à turvação e aumento do rendimento em etanol (HACKSTAFF, 1978).

Enquanto alguns fabricantes de cerveja trabalham com mostos de 17,5-18°P, ensaios em escala-piloto demonstraram a possibilidade de utilizar mostos com gravidade muito alta (*very high gravity* - VHG) de 20-25°P, sem prejuízo ao sabor característico da cerveja (CASEY; MAGNUS; INGLEDEW, 1984; MCCAIG et al., 1992).

A utilização de mostos VHG ainda não foi adotado pela indústria cervejeira, pois está associada com a redução nas taxas de fermentação, produção elevada de ésteres, extensão da duração da fase de latência, instabilidade da espuma, aumento das concentrações de açúcares residuais e geração de culturas de leveduras com baixo potencial de fermentação. A utilização de mostos VHG em escala industrial certamente irá

requerer a otimização de alguns parâmetros, por exemplo, tolerância e desempenho da estirpe de levedura (GIBSON, 2011).

O emprego do processo de alta densidade não é apropriado para todos os tipos de cerveja. O uso de mostos concentrados, principalmente os obtidos com 100% de malte, pode causar carga excessiva nas tinas de mostura e nos tanques de clarificação ou filtração, perdendo os benefícios do processo em relação à produtividade e qualidade. No entanto, para cervejas em cuja composição do mosto participa adjuntos estas dificuldades são evitadas (MURRAY; STUWART, 1995).

3.7. Envelhecimento de cervejas

No passado, as cervejas eram produzidas por pequenas empresas e eram restritas aos mercados locais. Contudo, devido à globalização do mercado, os volumes de produção e exportação de cervejas aumentaram rapidamente e isto resultou em tempos de transporte mais longos e variáveis condições de armazenamento, que exigem uma maior atenção na estabilidade das cerveja (GONÇALVES et al., 2010).

Sabe-se que os compostos carbonílicos, particularmente os aldeídos, desempenham um papel importante na deterioração do sabor e aroma de cervejas durante o armazenamento; e o desenvolvimento destes sabores típicos do envelhecimento tem sido associados à oxidação de álcoois superiores, oxidação de ácidos derivados do lúpulo, degradação de Strecker, oxidação de ácidos graxos e condensações aldólicas (VESELY et al., 2003).

Nem todos os sabores associados com o envelhecimento da cerveja são necessariamente considerados “*off-flavors*”, sendo que às vezes eles são até mesmo desejados pelos consumidores. O que ocorre, é que quando uma determinada marca de cerveja não cumpre as expectativas do consumidor; já que o sabor esperado é o da cerveja fresca, e o produto apresenta sabores envelhecidos, isso pode levar à rejeição da marca (BAERT et al., 2012).

Em cervejas do tipo *lager*, por exemplo, o sabor de “papelão” é conhecido como o principal “sabor de envelhecimento”. Este atributo negativo aparece depois da fase lag, durante a fermentação, e aumenta ao longo do processo fermentativo (DALGLIESH, 1977).

O envelhecimento não é somente caracterizado por um aumento de efeitos indesejáveis no sabor e aroma das cervejas, mas a redução de agradáveis sabores fresco, tais como floral, frutado e aromas de ésteres (SAISON et al., 2009).

Muitas reações químicas ocorrem durante o armazenamento da bebida, indicando que a cerveja fresca contida em garrafas não está em um equilíbrio químico. Além disso, a cerveja engarrafada não é um sistema perfeitamente fechado. Portanto, para retardar as reações químicas na cerveja e evitar seu envelhecimento, é conveniente para manter a temperatura de armazenamento a mais baixa possível, tomando cuidado com outros fatores, tais como formação de turvação (BAERT et al., 2012).

REFERÊNCIAS

- AGU, R. C. Comparative study of experimental beers brewed from millet, sorghum and barley malts. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1-3, 1995.
- AGU, R. C.; PALMER, G. H. A reassessment of sorghum for larger beer brewing. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 253-261, 1998.
- AITKEN, A. R.; BRUCE, A.; HARRIS, J. O.; SEATON, J. C. The bitterness of hop-derived materials in beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 76, p. 29-36. 1970.
- ANDREÂS-TOROA, B.; GIROÂN-SIERRAA, J.M.; LOÂPEZ-OROZCOA, J.A.; FERNAÂNDEZ-CONDEA, C.; PEINADOB, J. M.; GARCIAA-OCHOAC, F. A kinetic model for beer production under industrial operational conditions. **Mathematics and Computers in Simulation**, v. 48, p. 65-74, 1998.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 271, de 22 de setembro de 2005**. Aprova o "Regulamento técnico para açúcares e produtos para adoçar". Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ca624500474594079ba5df3fbc4c6735/RDC_271_2005.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 25/02/2014.
- BAERT, J. J.; DE CLIPPELEER, J.; HUGHES, P. S.; DE COOMAN, L.; AERTS, G. On the origin of free and bound staling aldehydes in beer. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 60, p. 11449-11472, 2012.
- BAYMA, C. A cana na pequena indústria: mel de engenho. **Brasil Açucareiro**, v. 80, n. 6, p. 11-17, 1978.
- BOTELHO, B. G. **Perfil e teores de aminas bioativas e características físico-químicas em cervejas**. 2009. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2009.
- BRAGA, V. S. **A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para produção de cachaça**. 2006. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba - SP, 2006.

BRAGANÇA, M. G. L. Processamento artesanal da cana-de-açúcar. **Informe Agropecuário**, v. 28, p. 78-81, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 54, de 05 de novembro de 2001**. Dispõe sobre a necessidade de estabelecer a identidade e a qualidade dos produtos de cervejaria destinados ao consumo humano. Disponível em: < <http://www.cervesia.com.br/downloads/legislacao/aspectos-legais/31-ano-2001-instrucao-normativa-no-54-de-5-de-novembro-de-2001/file.html> > . Acesso em: 30/03/2015.

BRIGGS, D.E.; BOULTON, C.A.; BROOKES, P.A; STEVENS, R. Brewing: science and practice. U.S.A. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2004, p. 85-201. 2004.

BUCHELI, C. S.; ROBINSON, S. P. Contribution of enzymatic browning to color in sugarcane juice. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 42, n. 2, p. 257-261, 1994.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1º parte – as leveduras. **Revista Analytica**, n. 25, p. 36-42, 2006.

CARVALHO, L. R.; MAGALHÃES, J. T. Avaliação da qualidade microbiológica dos caldos de cana comercializados no centro de Itabuna - BA e práticas e produção e higiene de seus manipuladores. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 31, n. 2, p. 240-247, 2007.

CARVALHO, G. B. M. **Obtenção de cerveja usando banana como adjunto e aromatizante**. 2009. 163f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial - Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (USP), Lorena - SP, 2009.

CARVALHO, G. B. M.; SILVA, D. P.; TEIXEIRA, J. A.; SILVA, J. B. A. Cerveja a partir de banana como adjunto do malte. In: Venturini Filho, G. W. **Ciência e Tecnologia de Bebidas**. São Paulo: Edgar Blücher, 2009.

CASEY, G. P.; MAGNUS, C. A.; INGLEDEW, W. M., High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability and alcohol production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 639-646, 1984.

CASTRO, R. F. **Relatório e voto referente ao Ato de concentração nº58/95**, Brasília, 1997.

CEPPI, E. L. M.; BRENNA, O. V. Brewing with rice malt: a gluten-free alternative. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 116, n. 3, p. 275-279, 2010.

CEREDA, M. P. Cervejas. In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgar Blucher, 1983, p. 3-78.

CEREDA, M. P.; VENTURINI FILHO, W. A. Cerveja. In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher: 2005. 523p. v.4.

CESAR, M. A. A.; SILVA, F. C. **A cana de açúcar como matéria prima para a indústria sucroalcooleira**. Piracicaba: ESALQ/Depto. de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, 1993. 107p.

COGHE, S.; VANDERHAEGEN, B.; PELGRIMS, B.; BASTEYNS, A.-V.; DELVAUS, F., Characterization of dark specialty malts: new insights in color evaluation and pro- and antioxidative activity. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 61, p. 125-132, 2003.

COGHE, S.; D'HOLLANDAER, H.; VERACHTERT, H.; DELVAUX, F. R. Impact of dark specialty malts on extract composition and wort fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 111, n. 1, p. 51-60, 2005.

COLLIN, S.; DERDELINCKX, G.; DUFOUR, J. Relationship between the chemical composition and sensory evaluation of lager beers. **Food Quality and Preference**, v. 5, p. 145-149, 1994.

CRUZ, J. M. M. Produção de cerveja. In: FONSECA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. **Reactores biológicos: fundamentos e aplicações**. Lisboa/Porto: Lidel, 2007. p. 277-305.

DALGLIESH, C. E. Flavour stability. In **Proceedings of the 16th Congress of the European Brewery Convention**, Amsterdam, The Netherlands, 1977; pp 623-659.

DELGADO, A. A.; OLIVEIRA, E. R.; STUPIELLO, J. P.; CESAR, M. A. A.; VALSECHI, O. A cana de açúcar como matéria prima. In: Tecnologia dos produtos agropecuários I: parte I – tecnologia do açúcar. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP, 1975. p. 7-14.

DELGADO, A. A.; CESAR, M. A. A. **Elementos de tecnologia e engenharia do açúcar de cana**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP, 1977. 752p. v. 2.

DEQUIM, S. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 577-588, 2001.

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; SILVA, J. B. A. Utilização de mostos concentrados na produção de cervejas pelo processo contínuo: novas tendências para o aumento da produtividade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 37-40, 2007.

E-NEWS CERVESIA, ano 10, n. 89, Edição julho de 2011. Disponível em: <<http://www.cervesia.com.br/biblioteca-tecnica/category/14-.html>>. Acesso em: 11/04/2013.

ENGLMANN, J.; MIEDANER, H. Métodos de producción de cerveza: matérias primas y aditivos de uso corriente. **Brewing and Beverage Industry Español**, n. 3, p. 10-16, 2005.

ERNANDES, F. M. P. G. **Produção de levana por *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* utilizando três meios de cultura sintéticos e um alternativo (caldo de cana de açúcar)**. 2006. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto - SP, 2006.

FAGUNDES, A. D. R. **Características nutricionais com ênfase no ferro e capacidade antioxidante de melados produzidos em Santa Catarina**. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Nutrição), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2010.

FERNANDES, A.C. Refratômetro de campo. **Boletim Técnico Copersucar**, v. 19, p. 5-12, 1982.

FIORAVANTI, C. Os arquitetos da nova cana. **Pesquisa FAPESP**, p. 29-35, 2000.

FREITAS, G. L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Avaliação da atividade antioxidante de diferentes cervejas aplicando os métodos ABTS e DPPH. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 303-307, 2006.

FUMI, M. D.; GALLI, R.; LAMBRI, M.; DONADINI, G.; FAVERI, D. M. Effect of full-scale brewing process on polyphenols in Italian all-malt and maize adjunct lager beers. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 568-573, 2011.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica: revisão. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 9, n. 4/5, p. 35-40, 1991.

GIBSON, B. R. 125th Anniversary Review: Improvement of higher gravity brewery fermentation via wort enrichment and supplementation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 3, p. 268-284, 2011.

GOBATO, G.; KOLAS, G. A.; MARCHI, J. F.; MURAKAMI, J. L. G. **Cultivo e transformação da cana-de-açúcar**. Paraná: EMATER. 2002, 2ª ed.

GOLDAMMER, T. **The brewer's handbook**: the complete book to brewing beer. Virginia: Apex Publishers, 2008. p. 1-496.

GONCALVES, L. M.; MAGALHÃES, P. J.; VALENTE, I. M.; PACHECO, J. G.; DOSTÁLEK, P.; SÝKORA, D.; RODRIGUES, J. A.; BARROS, A. A. Analysis of aldehydes in beer by gas-diffusion microextraction: characterization by high-performance liquid chromatography–diode-array detection–atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3717-3722, 2010.

GRUJIC, O. Application of unconventional raw materials and procedures in wort production. **Application of Unconventional Raw Materials**, v. 105, n. 105, p. 275-278, 1999.

HACKSTAFF, B. W. Various aspects of high gravity brewing. **Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly**, v. 15, p. 1-7, 1978.

HANSEN, J.; KIELLAND-BRANDT, M. In: ZIMMERMAN FK, ENTIAN KD, (Eds.). **Yeast sugar metabolism, biochemistry, genetics, biotechnology and applications**. New York: Technomic Publishing, 1997. p. 527-559.

HANSEN, J.; KIELLAND-BRANDT M.; DE WINDE J. H. **Topics in current genetics**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2003. v. 2, p. 143-164.

HIFNAWY, M. S.; MANGOUD, A. M.; EISSA, M. H.; NOR EDIN, E.; MOSTAFA, Y.; ABOUEL-MAGD, Y.; SABEE, E. I.; AMIN, I.; ISMAIL, A.; MORSY, T. A.; MAHROUS, S.; AFEFY, A. F.; EL-SHORBAGY, E.; EL-SADAWY, M.; RAGAB, H.;

HASSAN, M. I.; EL-HADY, G.; SABER, M. The role of aflatoxin-contaminated food materials and HCV in developing hepatocellular carcinoma in Al-Sharkia Governorate, Egypt. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 34, p. 479-88, 2004.

JEREZ, M. C. D. **Estudo comparativo de diferentes metodos e condições de fermentação de melado de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis***. 1993.108 f. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.

KALNIN, J. L. **Avaliação estratégica para a implantação de pequenas cervejarias**. 1999. 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção e Sistemas) – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis- SC, 1999.

KITOKO, P. M.; OLIVEIRA, A. C.; SILVA, M. L. Avaliação microbiológica do caldo de cana comercializado em Vitória, Espírito Santo, Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 18, p. 73-77, 2004.

KODAMA, Y.; KIELLAND-BRANDT, M. C.; HANSEN, J. In: SUNNERHAGEN, P.; PIŠKUR, J. (Eds.). **Comparative genomics**. Berlin Heidelberg: Springer – Verlag, 2005. p. 145-164.

LEWIS, M. J.; YOUNG, T. W. **Brewing**. London: Chapman & Hall, 1995. 260p.

LEWIS, M. J. Beer and brewing, KIRK Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 5 ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. 2004. v. 3, p. 561-589.

LINKO, M.; HAIKARA, A.; RITALA, A.; PENTTILA, M. Recent advances in the malting and brewing industry. **Journal of Biotechnology**, n. 65, p. 85-98, 1998.

LUCCHESI, A. A. Processos fisiológicos da cultura da cana de açúcar (*Saccharum* spp). **Boletim Técnico ESALQ/CENA**, n. 7, p. 1-50, 1995.

MAGALHÃES, A. C. N. Ecofisiologia da cana de açúcar: aspectos do metabolismo do carbono da planta. In: CASTRO, P. R. C.; FERREIRA, S. O.; YAMADA, T. (Coord.) **Ecofisiologia da produção**. Piracicaba: Associação Brasileira para pesquisa do Potássio e do Fosfato, 1987. p. 113-118.

MATOS, G. F.; TEIXEIRA, J. A.; SILVA, D. P.; VICENTE, A. A.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; CARVALHO, G. B. M. **Análise da fermentação em biorreatores cilíndricos de bancada na elaboração de cerveja com adjunto de banana**. In:

XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS 17., 2 a 5 de Agosto de 2009. Natal/RN.

MATTOS, R. Vida de prateleira de cervejas - estabilidade microbiológica: Parte III. **Engarrafador Moderno**, n. 127, p. 30-34, 2004.

MATTOS, R. C. F. **Efeito das variáveis de transporte e estocagem sobre a estabilidade sensorial de cervejas tipo Pilsen**. 2007. 92f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas - SP, 2007.

MCCAIG, R.; MCKEE, J.; PFISTERER, E. A.; HYSERT, D. W., Very high gravity brewing-laboratory and pilot plant trials. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 50, p. 18-26, 1992.

MURRAY, C. R.; STUWART, G. G. **Experience with high-gravity lager brewing**. London: John Labatt Limited. Brewing Technical Affairs, 1995.

NOGUEIRA, L. C.; SILVA, F.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; TRUGO, L.C. Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, p. 207-210, 2005.

NUNES JR, D. M. S. Variedades de cana de açúcar. In: PARANHOS, S. B. **Cana de açúcar: cultivo e utilização**. São Paulo: Fundação Cargill, 1987. 856p., v. 1, cap. 2, 187-259p.

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: MAKRON Books, 1996. p. 333.

PIDDOCKE, M.; OLSSON, L. Beer brewing, applications of metabolic engineering. In: **ENCYCLOPEDIA of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology**, edited by Michael C. Flickinger. John Wiley & Sons, Inc. 2009. p. 1-23.

PINTO, G. L.; COELHO, D. T. Produção de melado no meio rural. **Informe Técnico**. Universidade Federal de Viçosa, 1983.

POLLOCK, J. R. A. **Brewing science**. London: Academic Press. 1979. v. 1. 604p.

PUSECKER, K.; ALBERT, K.; BAYER, E. Investigation of hop and beer bitter acids by coupling of high-performance liquid chromatography to nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Chromatography A**, v. 836, p. 245-252, 1999.

QUDSIEH, H. Y. M.; YUSOF, S.; OSMAN, A.; RAHMAN, R. A. Effect of maturity on chlorophyll, tannin, color and polyphenol oxidase (PPO) activity of sugarcane juice (*Saccharum officinarum* Var. Yellow Cane). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 1615-1618, 2002.

REINOLD, M. R. **Manual prático de cervejaria**. São Paulo: Aden, 1997. 214p.

RIBEIRO, F. J.; LOPES, J. J. C.; FERRARI, S. E. Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica. **Brasil Açucareiro**, v. 105, n. 1, p. 26-30, 1987.

RODRIGUES, J. D. **Fisiologia da cana de açúcar**. Botucatu-SP, Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências – SP, 1995. p.1-2, 8-9, 13.

ROY, G. Bitterness: reduction and inhibition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 3, p. 85-91, 1992.

RUSSEL, I. Yeast. In: HARDWICK, W. A. ed. **Handbook of brewing**. New York: Marcel Dekker, 1994. cap. 10, p. 169-186.

SACHS, R. C. C; MARTINS, V. A. **Informações Econômicas**, SP, v. 37, n. 9, set. 2007.

SAISON, D.; DE SCHUTTER, D. P.; UYTENHOVE, B.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. R. Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1206-1215, 2009.

SANTOS, C. D. O. **Avaliação do emprego do arroz preto (*Oryza sativa* L) submetido a hidrólise enzimática como adjunto na fabricação de cerveja**. 2011. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (USP), Lorena – SP, 2011.

SANTOS, M. C. **Utilização de alta pressão para aumentar o teor de xanto–humol no mosto de cerveja**. 2009. 83f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Química dos Alimentos) – Departamento de Química da Universidade de Aveiro, 2009.

SCULACCIO, S. A. **Clonagem e caracterização molecular da fosforribosil pirofosfato sintase (PRPP sintase) de cana de açúcar**. 2002. (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos - SP, 2002.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Pequenas e Micro Empresas. **Estudo Técnico das Alternativas de Aproveitamento da Cana-de-Açúcar**. Belo Horizonte, 2004.

SEIDL, C. **O catecismo da cerveja**. São Paulo: SENAC Editora, 2003. 385p.

SHWAN, R. F.; CASTRO, H. A. Fermentação. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana de açúcar**. Lavras: Ed. UFLA, 2001. cap. 3, p. 113-128.

SILVA, M. E. M. P.; EMIGDIO M. S.; SILVA, L. T. A.; SATOMI, M. **O uso de caldo de cana em preparações culinárias**. Fac. de Saúde Pública, USP, São Paulo: 2002.

SILVA, D. P. **Produção e avaliação sensorial de cerveja obtida a partir de mostos com elevadas concentrações de açúcares**. 2005. 177f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, 2005.

SILVA, J. B. A. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de bebidas: matéria prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado**. São Paulo: Edgar Blücher, 2005a. 550 p.

SILVA, P. H. A.; FARIA, F. C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 902-906, 2008.

SILVA, A. E.; COLPO, E.; OLIVEIRA, V. R.; HERBST JUNIOR, C. G.; HECKTHEUER, L. H. R.; REICHERT, F. S. Elaboração de cerveja com diferentes teores alcoólicos através de processo artesanal. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 3, p. 369-374, 2009.

SINDICERV. **Tipo de cerveja**. Disponível em: <www.sindicerv.com.br>. Acesso em: 15/09/2012.

SIQUEIRA, P. B.; BOLINI, H. M. A.; MACEDO, G. A. O processo de fabricação de cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 491-498, 2008.

SLEIMAN, M. **Determinação do percentual de malte de cevada em cervejas tipo pilsen utilizando os isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e do nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$).** 2006. 87f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Unesp, Botucatu - SP, 2006.

SLEIMAN, M.; VENTURINI FILHO, W. G.; DUCATTI, C.; NOJIMOTO, T. Determinação do percentual de malte e adjuntos em cervejas comerciais brasileiras através de análise isotópica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 163-172, jan./fev., 2010.

SOCCOL, C. R.; SCHWAB, A.; KATAOKA, C. E. Avaliação microbiológica do caldo de cana na cidade de Curitiba. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento**, Curitiba, v. 8, p. 116-125, 1990.

SOHRABVANDI, S.; MOUSAVI, S. M.; RAZAVI, S.H.; MORTAZAVIAN, A. M.; REZAEI, K. Alcohol-free beer: methods of production, sensorial defects, and healthful effects. **Food Reviews International**, v. 26, n. 4, p. 335-352, 2010.

STEWART, G. G.; RUSSEL, I. Modern Brewing Biotechnology. In: MOO-YOUNG, M. **Comprehensive biotechnology: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine.** Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 3, cap. 17, p. 335-379.

STEWART, G. G. A Brewer's delight. **Chemistry and Industry**, p.706-709, 2000.

STUPIELLO, J. P. A cana de açúcar como matéria prima. In: PARANHOS, S. B. **Cana de açúcar: cultivo e utilização.** Campinas: Fundação Cargill, 1987, v. 2, p. 761-804.

SUZUKI, K.; IIJIMA, K.; SAKAMOTO, K.; SAMI, M.; YAMASHITA, H. A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, p. 173-191, 2006.

SUZUKI, K. 125th Anniversary review: microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. **The Institute of Brewing & Distilling**, v. 117, n. 2, 2011.

TACO. **Tabela brasileira de composição de alimentos.** 2ª ed. Campinas: NEPAUNICAMP. 2006.

TANO, M. S.; BUZATO, J. B. Effect of the presence of initial ethanol on ethanol production in sugar cane juice fermented by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 242-244, 2003.

TSCHOPE, E. C. **Microcervejarias e cervejarias**. A história, a arte e a tecnologia - São Paulo: Editora Arden, 2001. 223f.

VALMORBIDA J; ZARPELLON, I. A; BRAGA, B. P. **Transformação artesanal da cana-de-açúcar**. Curitiba: EMATER-PR, 1993.

VANHOECKE, B.; DERYCKE, L.; VAN MARCK, V.; DEPYPERE, H.; DE KEUKELEIRE, D.; BRACKE, M. Antiinvasive effect of xanthohumol, a prenylated chalcone present in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. **International Journal of Cancer**, v. 117, p. 889-895, 2005.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Bebidas**: tecnología, química y microbiología. Espanha: Editora Acribia, 1997. cap. 7, p. 307-375.

VAUGHAN, A.; O'SULLIVAN, T.; SINDEREN, D. V. Enhancing the microbiological stability of malt and beer: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 111, n. 4, p. 355-371, 2005.

VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. Hidrolisado de fécula de mandioca como adjunto de malte na fabricação de cerveja: avaliação química e sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 2, Maio 1998.

VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de cerveja**. Jaboticabal: Funep, 2000. 83 p.

VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. Cerveja. In: ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v. 4. p. 91-144.

VERZELE, M.; DE KEUKELEIRE, D. **Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids**. Amsterdam: Elsevier, 1991.

VESELY, P.; LUSK, L.; BASAROVA, G.; SEABROOKS, J.; RYDER, D. Analysis of aldehydes in beer using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 6941-6944, 2003.

WHITE, C.; ZAINASHEFF J. **Yeast**: the practical guide to beer fermentation, Colorado: Brewers publication, 2010. 304p.

WHITE, J. B. **Yeast technology**. London: Chapman & Hall, 1954. 431p.

CAPÍTULO 2 – QUALIDADE DA ÁGUA CERVEJEIRA E ESTUDO DO PROCESSO FERMENTATIVO DE CERVEJAS PURO MALTE E COM ADIÇÃO DE CALDO OU MELADO DE CANA

1. INTRODUÇÃO

A legislação brasileira (BRASIL, 2009) define cerveja como sendo “a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo”. Parte do malte de cevada poderá ser substituída por adjuntos cervejeiros, cujo emprego não poderá ser superior a 45% em relação ao extrato primitivo, isto é, extrato do mosto de malte de origem da cerveja.

Segundo Meussdoerffer e Zarnkow (2009) as razões para o uso de matérias primas diferentes do malte de cevada são três: preço favorável, disponibilidade em regiões não apropriadas à produção de cevada e características especiais de cor e aroma na bebida desenvolvida.

Os principais fatores determinantes da aceitabilidade de um adjunto que possua elevada qualidade para a produção de cerveja são os seus componentes químicos, como amido, proteínas, sais minerais e lipídios, com o objetivo de produzir um mosto que tenha composição desejada de carboidratos em solução para ter-se uma boa fermentação (BRIGGS et al., 2004).

O caldo de cana contém 13-16% (p/v) de sacarose, ou seja, é uma fonte abundante e barata deste carboidrato (TIMBUNTAM; SRIROTH; TOKIWA, 2006).

A cerveja do tipo Pilsen (ou Pilsener) é a líder absoluta na preferência dos consumidores mundiais e corresponde a 98% do mercado brasileiro de cerveja. A tendência do setor, confirmada por especialistas, fabricantes e cervejeiros, segue os passos de outras partes do mundo, como nos Estado Unidos, onde uma revolução no consumo fez aumentar o número de microcervejarias existentes no país. No Brasil, o processo é lento, mas está ocorrendo gradativamente e com mais intensidade nos últimos anos. A expansão das microcervejarias é resultado da curiosidade dos consumidores pelas chamadas cervejas especiais (BRUNELLI, 2012).

É interessante estudar o efeito de adjuntos em cervejas do tipo Pilsen, como caldo ou melado de cana, verificando o processo fermentativo e também avaliar diversas características

do produto final, tal como a cor das cervejas. Além disso, o Brasil é um grande produtor de cana de açúcar e o uso desses adjuntos pode reduzir o custo da bebida e também gerar uma cerveja de qualidade.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi analisar a água cervejeira, produzir e acompanhar os processos fermentativos de cervejas elaboradas com caldo e melado de cana como adjuntos do malte.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios fermentativos foram conduzidos em escala de bancada, no Laboratório de Bebidas Fermentadas e Planta Piloto, do Departamento de Biotecnologia, da Escola de Engenharia de Lorena – USP.

2.1. Material

2.1.1. Água

A água utilizada no processo de produção do mosto cervejeiro foi obtida do poço artesiano que abastece a Escola de Engenharia de Lorena.

2.1.2. Malte de cevada

O malte de cevada utilizado foi o malte claro tipo Pilsen, doado pela Malteria do Vale S/A, de Taubaté – SP, em sacos de 50 Kg.

2.1.3. Lúpulo

O lúpulo do tipo Saaz foi fornecido pela Vallerstein Industrial Ltda, de São Paulo, SP.

2.1.4. Leveduras

Foram utilizadas duas linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01 e PPB02, identificadas pela Universidade Federal de Lavras.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01 é do tipo *lager* e a PPB02 foi isolada a partir de caldo de cana pela professora Dra. Maria Bernadete de Medeiros, docente do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena.

A cultura estoque das leveduras foi mantida em tubos de ensaio, contendo ágar malte inclinado, e conservada a 4°C sob refrigeração.

2.1.5. Cana de açúcar

Foi utilizado caldo de cana de açúcar (*Saccharum* spp), comercializado na cidade de Lorena, São Paulo, SP.

2.1.6. Melado de cana

O melado utilizado na escala laboratorial foi elaborado a partir da concentração do caldo de cana, até atingir 65°Brix.

2.2. Métodos

2.2.1. Análise da água

A água utilizada para a produção de cerveja foi analisada físico-quimicamente e microbiologicamente no Departamento de Hidráulica e Saneamento da USP, São Carlos, SP.

Foram determinados os seguintes parâmetros físico-químicos da água: dureza total, nitrato e cloreto (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), pH por potenciometria, utilizando pHmetro MA-522 (Marconi), turbidez, utilizando turbidímetro (2100P turbidimeter - Hach) e cor por meio do colorímetro DM-COR (Digimed).

As determinações de ferro, magnésio, manganês e zinco foram feitas por espectroscopia de absorção atômica com chama (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Para as análises microbiológicas, a água presente em frasco estéril, foi homogeneizada e a partir dela, 100 µL da amostra foi semeada, com o auxílio de alça de Drigalsky esterilizada, na superfície do meio Chromocult® Coliform Agar (Merck), para a contagem de coliformes totais e fecais; e em placas de PCA (Plate Count Agar - Difco) para a contagem de bactérias heterotróficas. As placas foram incubadas à 37°C, por 24 horas (Figura 1).

Figura 1 – Fluxograma com procedimentos para determinação de coliformes totais, fecais e bactérias heterotróficas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Após 24 horas, foi realizada a contagem de bactérias nas placas do meio Chromocult® Coliform Agar e PCA, e os valores foram expressos em UFC/mL.

2.2.2. Obtenção do caldo de cana

A cana de açúcar foi prensada em cilindros de uma moenda (Moedor de Cana Tradicional Elétrico Rolo Inox B-721T), separando-se o caldo e o bagaço, onde o caldo obtido foi colocado em garrafas de vidro esterilizadas e acondicionadas em isopor com gelo e trazidas imediatamente ao laboratório para a produção dos mostos.

2.2.2.1. Clarificação do caldo de cana

O caldo extraído foi submetido a dois tipos de tratamentos para a clarificação, buscando a remoção de partículas sólidas e obtenção de um caldo mais límpido, através da decantação das impurezas.

Um dos tratamentos de clarificação testado, denominado de clarificação parcial do caldo, foi feito conforme procedimento estabelecido por Prati e Moretti (2002), em que o caldo de cana foi parcialmente clarificado e estabilizado pelo aquecimento em banho-maria (Cientec) à 65°C por 50 minutos, alcalinizado com solução de hidróxido de cálcio 2M

(Synth) até pH 8,0 e adicionado de 60 mg/L de policloreto de alumínio (Cromoline), permanecendo por 45 minutos para que ocorresse a decantação das impurezas.

Outro tratamento de clarificação foi feito de acordo com a metodologia descrita no manual de instruções do CONSECANA (2006), em que foi preparada uma mistura composta de 71,5 g de hidróxido de cálcio (Synth), 285,5 g de celite (Synth), 143,0 g de cloreto de alumínio (Cromoline), triturada em almofariz. 7 g da mistura foi adicionada à 150 mL de caldo de cana, seguida de agitação por 1 minuto e filtração em papel de filtro. Esse tratamento foi denominado de clarificação do caldo de cana e foi feito apenas para a avaliação da cor da cerveja final, e não ensaios de fermentação.

2.2.2.2. Melado de cana como adjunto

Para a obtenção do melado, o caldo foi colocado em um erlenmeyer e submetido ao aquecimento em chapa aquecedora MA-038 (Marconi) atingindo fervura vigorosa até que a concentração de açúcares alcançasse 65°Brix, que foi medido em um refratômetro digital portátil (Atago). Este concentrado foi feito a partir de caldo de cana com ou sem clarificação prévia, conforme item 2.2.1.1.

2.2.2.3. Determinação dos ensaios de fermentação

Foram feitos 8 ensaios de fermentação utilizando duas diferentes proporções de caldo ou melado de cana, com tratamento de clarificação parcial, ou sem nenhum tratamento, a fim de verificar a melhor condição de fermentação para o desenvolvimento de um novo produto (Tabela 3). Todos os ensaios foram feitos em duplicata.

Foi adicionado 25% de caldo de cana ou melado e 75% de malte e também, adicionado 50% de caldo de cana e 50% de malte. Os ensaios foram realizados utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01.

Tabela 3 – Ensaaios preliminares com diferentes condições de experimentos.

	Proporção	Tratamento
Ensaio 1	25M	parcialmente clarificado *
Ensaio 2	25M	cru (sem tratamento)
Ensaio 3	25C	parcialmente clarificado *
Ensaio 4	25C	cru (sem tratamento)
Ensaio 5	50M	parcialmente clarificado *
Ensaio 6	50M	cru (sem tratamento)
Ensaio 7	50C	parcialmente clarificado *
Ensaio 8	50C	cru (sem tratamento)

25M: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; 50M: cerveja elaborada com 50% de melado de cana; 25C: cerveja elaborada com 25% de caldo de cana; 50C: cerveja elaborada com 50% de caldo de cana.

* Segundo Prati e Moretti, 2002.

Esses ensaios foram feitos para obter o volume de 1 litro de mosto a fim de verificar o processo fermentativo.

2.2.3. Moagem do malte

O malte de cevada foi moído 2 vezes consecutivas em moinho de rolos motorizado com distanciamento entre os rolos calibrado em 0,7 mm, para obtenção da granulometria adequada para a mosturação.

2.2.4. Mosturação

O processo de mosturação foi realizado em um banho de brassagem (Lochner Labor ⁺Tecnik), com quatro recipientes com capacidade de 500 mL cada um, seguindo um padrão de tempo/temperatura para a hidrólise do amido.

A temperatura variou de 48 a 78°C e o pH inicial foi ajustado, quando necessário, em torno de 5,5 pela adição de solução de ácido láctico (Synth). Foi adicionado CaCl₂ (Synth) na proporção de 1,26 g/Kg de malte.

O perfil de tempo e temperatura de ativação de cada enzima foi de 48, 52, 63, 70 e 78°C por 20, 20, 60, 30 e 10 minutos, respectivamente, conforme mostra a Figura 2.

Figura 2 – Perfil de tempo e temperatura no processo de mosturação por infusão.

Fonte: Arquivo pessoal.

No final da mosturação, em 70°C, foi realizado o teste com solução de iodo 0,02N a fim de verificar a sacarificação do amido do malte. Após a confirmação da hidrólise desta macromolécula, pela ausência da cor roxo-azulada, característica da reação com a solução de iodo, em temperatura ambiente, o mosto foi aquecido até 78°C com o objetivo de inativar as enzimas presentes e finalizar o processo de mosturação.

2.2.5. Filtração/Clarificação do mosto

Após o término da hidrólise, o mosto, chamado de mosto primário, foi filtrado com peneiras de inox (0,6 mm) para a separação das cascas do malte, sendo que a camada filtrante formada pela própria casca do malte de cevada serviu de filtro para a lavagem com água secundária a 80°C, originando o mosto secundário.

Esse volume de água secundária serviu para a extração dos açúcares residuais impregnados nas cascas do malte, portanto, o mosto secundário é oriundo da água de lavagem do bagaço de malte.

2.2.6. Fervura do mosto

O mosto misto, junção dos mostos primário e secundário, obtido após a filtração, foi submetido à fervura, em erlenmeyer de 6000 mL, em chapa aquecedora MA-038 (Marconi) por um período de 60 minutos, até atingir a concentração final de açúcares em 16°P de extrato original (primitivo).

Durante a fervura, foi adicionado lúpulo na forma de pellets, em proporções de 1,8 g/L no mosto acabado, sendo que no início da fervura foi acrescentado o lúpulo na concentração de 0,9 g/L em relação ao volume inicial e 0,9 g/L nos 15 minutos antes de completar o tempo de fervura total que foi de 1 hora.

Após o término da fervura, o mosto foi resfriado, em câmara fria, até atingir a temperatura de fermentação de 12°C, para a formação de aglomerados protéicos comumente conhecidos como *trub*, e aguardado o tempo necessário para que o líquido ficasse totalmente em repouso, e o *trub* pudesse ser retirado.

2.2.7. Preparação do inóculo

Da cultura estoque da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01 e PPB02, cultivadas em tubos de ensaio contendo meio inclinado de ágar extrato de malte (Merck), e conservada a 4°C, por 48 horas, foi feita a transferência das células em condições assépticas para um tubo contendo 10 mL de mosto na concentração de 6°P. O cultivo foi realizado em estufa a 30°C por 24 horas.

Em seguida este volume de meio foi transferido para um erlenmeyer de 125 mL, contendo 90 mL de mosto na concentração de 12°P, totalizando 100 mL. O cultivo foi feito sob agitação, a 200 rpm e a temperatura de 30°C, até que concentração de açúcares abaixasse para 6°P (aproximadamente 24 horas).

O próximo passo foi transferir o volume de 100 mL para 900 mL de mosto em um erlenmeyer de 2000 mL a 16°P, também sob agitação constante a 200 rpm e temperatura de 30°C, e o tempo de cultivo deste inóculo foi mantido por 24 horas. O volume final de cultivo foi mantido em geladeira para a decantação das células e concentração das mesmas. Foi retirado o sobrenadante e efetuada a contagem de células no “creme” de leveduras que ficou retido na parte de baixo do Erlenmeyer.

2.2.8. Fermentação

A fermentação foi iniciada com uma concentração celular de $1,6 \times 10^7$ células/mL em cada um dos fermentadores, contendo mosto na concentração de 16°P.

Os ensaios de fermentação foram conduzidos em garrafas PET invertidas de 2000 mL, como mostra a Figura 3, com dois pontos de saída com a inserção de mangueiras de silicone. Uma delas para a retirada de amostra (parte de baixo) e a outra para a o controle da pressão interna (parte de cima), exercida pela formação de CO₂.

A mangueira de retirada de amostra atingia uma localização intermediária do volume de mosto contida na garrafa (1000 mL), para garantir a retirada das células em suspensão.

As fermentações foram conduzidas à 12°C, em câmara fria e quando a concentração de açúcares atingiu a atenuação limite, ou seja, com a estabilização do extrato, a fermentação foi finalizada.

Figura 3 – Fermentadores adaptados com garrafas PET de 2000 mL.

Fonte: Arquivo pessoal.

2.2.9. Maturação

Para as análises de cor, a cerveja foi maturada a 0°C por 2 semanas, em câmara fria, no mesmo recipiente em que ocorreu a fermentação.

2.2.10. Teste de atenuação limite

Foram feitos testes de atenuação limite dos mostos puro malte e com adição de caldo de cana, para verificar o fim do processo fermentativo.

O teste foi feito segundo o manual “Métodos de Análisis Cerveceros” (1999), com mostos puro malte; 75% malte e 25% caldo de cana e 50% malte e 50% caldo de cana.

Segundo esse manual, o mosto fermenta até o máximo em um erlenmeyer após adição de levedura e agitação. O grau de fermentação final se calcula pela diferença de extrato antes da fermentação (extrato original) e depois da fermentação (extrato aparente).

Esse teste é utilizado para verificar o fim da fermentação, porém, ainda sobra uma quantidade de açúcares, mas estes não são fermentescíveis. Essa condição chama-se atenuação limite, isto é, quando o mosto atinge esse grau de fermentação final dos açúcares fermentescíveis.

Para a realização desse teste, adicionou-se 15g de creme de levedura em um erlenmeyer contendo 200 mL de mosto com extrato original conhecido, no caso de 16°P. O frasco foi colocado em uma mesa agitadora refrigerada (Cientec), a 100 rpm e temperatura de 25°C. Amostras foram retiradas para a verificação da densidade até a estabilização desse valor.

Amostras de 5 mL foram coletadas do erlenmeyer em capela de fluxo laminar, colocadas em tubos “falcon” e foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos. Em seguida foi retirado o gás do sobrenadante pela agitação vigorosa do tubo e o líquido foi injetado em um analisador de cerveja (Beer Analyser 2, ANTON-PAAR®, Áustria).

Esses testes foram realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01 com mostos puro malte, com 50% e 25% de caldo de cana respectivamente, e, também foi realizado o teste com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB02 com mosto puro malte.

2.2.11. Avaliação da cor das cervejas finais

Foram elaboradas 13 cervejas para a obtenção da cor, sendo elas: puro malte e com adição de 25% e 50% de caldo de cana cru (sem tratamento), parcialmente clarificado e clarificado segundo os tratamentos usados no item 2.2.1.1. Também foram feitas cervejas com melado de cana cru, parcialmente clarificado e clarificado também nas proporções de 25% e 50%.

Todas essas cervejas foram fermentadas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01.

Ao final da fermentação, foram feitas análise da cor segundo o método 9.6. da EUROPEAN BREWERY CONVENTION – EBC (2000), onde amostras de 5 mL de cada cerveja foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos e a absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-visível Ultrospec 3100 pro (Amersham Biosciences) no comprimento de onda 430 nm, em cubetas de 1 cm.

A unidade de cor é dada em unidades EBC e é obtida pela multiplicação da absorbância por um fator (em caso de cervejas escuras, mas não foi necessário diluir as cervejas no presente estudo) conforme a equação abaixo:

$$Cor (Unidades EBC) = A \times f \times 25$$

Sendo:

A: absorbância a 430 nm em cubeta de 1 cm;

f: fator de diluição

As análises de cor também foram realizadas em 5 cervejas claras comerciais a fim de comparação com os valores obtidos para as cervejas elaboradas no presente estudo.

2.2.12. Acompanhamento analítico dos experimentos

Com o objetivo de conhecer o perfil do processo fermentativo das diferentes cervejas com diferentes proporções de malte e caldo de cana ou melado, foram feitas as seguintes análises físico-químicas:

- Teor alcoólico, extrato aparente, densidade, grau de fermentação aparente: determinados em um analisador de cerveja (Beer Analyser 2, ANTON-PAAR®, Áustria);
- pH: por potenciometria, com auxílio de pHmetro MA-522 (Marconi).

Durante todo o processo de fermentação foram retirados 6 mL de amostras, periodicamente a cada 8 horas, sem que isso compromettesse os 10% de volume máximo que pode ser retirado de um biorreator.

Inicialmente foram medidos o pH das amostras em pHmetro de bancada e em seguida, as mesmas foram desgaseificadas pela agitação vigorosa dos tubos durante 1 minuto.

O sobrenadante obtido após a centrifugação a 4000 rpm por 20 min foi utilizado para quantificar o extrato aparente (ou concentração aparente de açúcares totais), etanol e densidade do mosto em um analisador de cerveja (Beer Analyser 2, ANTON-PAAR®, Áustria); e o resultado de açúcares, etanol e densidade foram expressos em °Plato, % v/v e g/mL respectivamente.

2.2.13. Contagem de células

A contagem de células em suspensão foi efetuada por contagem em câmara de Neubauer ($1/400 \text{ mm}^2 \times 1/10 \text{ mm}$) e expressa em células/mL. A determinação da viabilidade celular (células viáveis e não viáveis) foi realizada pelo método internacional de coloração com azul de metileno segundo AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS - ASBC (1996), cujo resultado foi expresso em %.

2.2.14. Análise dos Resultados

Os experimentos foram inteiramente casualizados, realizados em duplicata e, para todas as análises foram calculadas médias e desvio padrão.

Foi realizada também a avaliação da produtividade volumétrica e do rendimento da fermentação, também denominado de fator de conversão de substrato em produto, a partir das equações abaixo, de acordo com Borzani (1986) e Moser (1988):

1) Produtividade volumétrica em etanol (g/L.h):

$$Q_P = \frac{Pt - Pi}{t - ti}$$

2) Rendimento em etanol (g/g):

$$Y_{P/S} = \frac{Pt - Pi}{Si - St}$$

Onde:

Si e St: Concentração de extrato aparente inicial e no tempo final t (g/L)

Pi e Pt: Concentração de etanol inicial e no tempo final t (g/L)

ti e t : Tempo inicial e tempo final t de fermentação (h)

Para os cálculos de rendimento e produtividade, a conversão de unidades das concentrações de extrato aparente (°P) e do etanol (%v/v) para (g/L), foram realizados de acordo com as equações abaixo, segundo Carvalho (2009).

$$\text{Extrato aparente (g/L)} = \text{Extrato aparente (°P)} \times \text{Densidade do mosto (g/mL)} \times 10$$

$$\text{Etanol (g/L)} = \text{Etanol (\%v/v)} \times 0,789 \text{ (g/mL)} \times 10$$

Onde: 0,789 (g/mL) é a densidade do etanol à 20°C.

Os dados experimentais das fermentações em pequena escala realizadas foram plotados em gráficos no software OriginPro® 8.0 (OriginLab Corporation).

Foram verificadas as seguintes variáveis: consumo de extrato, produção de etanol, pH, crescimento celular e viabilidade, produtividade volumétrica em etanol (Qp) e fator de conversão de substrato em produto (Y_{P/S}).

Os dados referentes às comparações de rendimento e produtividade entre os ensaios foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para a comparação das médias, foi aplicado o teste de Tukey, ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Análise da água

Os resultados das análises físico-químicas da água utilizada no presente trabalho foram comparados aos valores sugeridos pela indústria cervejeira; conforme descrito em SENAI (1997) e encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Características físico-químicas da água utilizada na Microcervejaria (DEbiq/EEL) em comparação aos valores sugeridos pela indústria cervejeira, conforme descrito em SENAI (1997).

Características físico-químicas	Micro-cervejaria	Padrão Industrial	Justificativa prática
odor	inodora	inodora	defeito sensorial (odor característico)
sabor	isenta	isenta	defeito sensorial (paladar)
aspecto	límpida	límpida	defeito sensorial (visual)
turbidez	0,54 UNT ¹	< 1 UNT	defeito sensorial (visual)
coloração	< 5 mg Pt/L ²	< 5 mg Pt/L	defeito sensorial (visual)
dureza total	26 mg/L ³	100 - 250 mg/L	dependente do tipo de cerveja desejada
cloretos	1,2 mg/L	< 100 mg/L	corrosão e gosto salgado
nitrato	0,19 mg/L	< 50 mg/L	alterações de fermentação
ferro	0,055 mg/L	< 0,1 mg/L	defeito sensorial (turvação e paladar)

¹UNT (Unidades Nefelométrica de Turbidez)

² medida realizada pela comparação com soluções de platina-cobalto

³ valores ajustados posteriormente pela adição de cloreto de cálcio na etapa de mosturação

O controle do pH da água é fundamental, pois um pH alcalino poderá ocasionar a dissolução de materiais existentes no malte e nas cascas, que são indesejáveis no processamento. O ideal é que se tenha uma relação ácida facilitando maior atividade enzimática, com um consequente aumento no rendimento de maltose, e um maior teor alcoólico. Em geral, o pH ideal da água para a fabricação de cerveja está em torno de 6,5 a 7,0, mas o tipo de cerveja a ser produzido é que vai determinar qual o pH ideal (PRESTES; CORDEIRO, 2008). No presente estudo, verifica-se que a água analisada tem o pH de 6,66, e está dentro do limite desejável.

A água é a matéria prima mais importante para a fabricação de cerveja, pois a cerveja é constituída de 95% de água, assim sendo as suas características físicas e químicas são de fundamental importância para se obter uma cerveja de boa qualidade. A água utilizada para fabricar cerveja obrigatoriamente tem de ser potável, podendo sofrer correções químicas de acordo com a sua composição (MAGALHÃES, 2006). Dessa forma, a água utilizada no presente trabalho caracteriza-se por ser uma água potável, sendo inodora, insípida, incolor e límpida, com turbidez menor do que 1 UNT, e coloração menor do que 5 mg Pt/mL.

As outras características analisadas também estão de acordo com os limites definidos para a qualidade da água em uma cervejaria industrial, de acordo com SENAI (1997), que são: cloreto menor do que 100 mg/mL, nitrato menor do que 50 mg/mL e ferro menor do que 0,1 mg/mL, sendo 1,2 mg/mL, 0,19 mg/mL e 0,055 mg/mL os valores respectivos.

Também foi analisado o teor de magnésio na água, que foi de 0,935 mg/L, e segundo Gibson (2011), as células de levedura tem uma exigência absoluta para magnésio, que atua como um cofator para muitas enzimas e é necessário particularmente para as enzimas envolvidas na glicólise, ou seja, a conversão eficiente de açúcar em álcool é, portanto, dependente de um suprimento adequado de magnésio biodisponível. Dessa forma, o magnésio é citado como um dos íons mais importantes no mosto em termos de desempenho de fermentação.

É provável que a maioria dos mostos cervejeiros não contenha níveis ótimos de magnésio, e mesmo quando este metal foi aumentado a partir de um nível basal de 75 mg/L para 135 mg/L, na fermentação de um mosto de 16°P, não foi observado uma performance na fermentação utilizando uma estirpe de levedura *lager*. Uma alternativa para a suplementação de mosto seria um pré-condicionamento de células de levedura, em mosto rico em magnésio. As células do meio rico em magnésio teriam maior produtividade em etanol em fermentações de mosto subsequentes (WALKER, 2000).

Cervejas do tipo *lager* são elaboradas com água com quantidades baixas de íons cálcio e magnésio, ou seja, com alcalinidade baixa (LEWIS, 2004).

Da mesma forma que o magnésio, o zinco também desempenha um papel crucial na fermentação e é comumente utilizado para complementar o mosto na indústria cervejeira. O mosto pode conter entre 0,1 e 5,0 mg/L de zinco e suas concentrações são dependentes de um número de fatores, incluindo o malte utilizado na preparação do mosto (GIBSON,

2011). No presente trabalho, o teor de zinco encontrado na água foi de 5,280 mg/L, ou seja, muito próximo do valor sugerido por Gibson (2011).

A água examinada está de acordo com os limites sugeridos, exceto para o íon cálcio que tem o limite de 100 - 250 mg/mL e na água analisada encontrou-se o valor de 26 mg/mL, mas isso pode ser resolvido adicionando cálcio durante o processo de mosturação, já que o cálcio tem alguns efeitos benéficos tais como: proteção da alfa-amilase, no melhoramento da precipitação das proteínas e limitação da formação de cores durante a fervura, melhoramento da floculação da levedura, remoção de oxalatos e estimulação da atividade das enzimas proteolíticas e amilolíticas (DIMAS, 2010). O cálcio também tem um papel importante na proteção das células contra os efeitos de toxicidade do etanol (NABAIS et al., 1988).

O cálcio foi adicionado na forma de CaCl_2 na proporção de 1,26 g/Kg de malte, conforme Carvalho (2009), no momento da mosturação.

O cálcio presente em cervejas, determinado através da dureza total, é derivado principalmente da água adicionada na mosturação. Outras fontes de cálcio podem ser creditadas ao solo, à adição de gesso, tanques de concretos não tratados, filtros e agentes de clarificação (DAUT et al., 1974).

A dureza da água é um fator determinante do “corpo” e cor da cerveja, verificando-se que cervejas mais fortes e escuras obtêm-se a partir de água rica em sais (água dura), ao passo que cervejas mais claras resultam da utilização de água com um teor de sais reduzido (água mole) (DIMAS, 2010).

Segundo Silva (2005a), alguns dos requisitos básicos para obter água cervejeira de qualidade são: seguir padrões de potabilidade; ser limpa, inodora e incolor; apresentar alcalinidade de 50 mg/L ou menor (preferencialmente inferior a 25 mg/L) e possuir concentração de cálcio ao redor de 50 mg/L.

Já o ferro tem um efeito negativo na etapa de mosturação, pois ele dificulta a sacarificação e “enfraquece” a levedura. No produto final age como catalisador na auto-oxidação dos polifenóis presentes na cerveja, acelerando a produção de turvações na cerveja e ainda confere um sabor metálico (DIMAS, 2010), o que não é problema na água analisada, já que o teor de ferro está abaixo do padrão industrial, conforme descrito anteriormente.

As águas utilizadas em microcervejarias, provenientes de um modo geral de tratamentos municipais ou de poços, devem ser regularmente analisadas quanto à dureza em carbonatos e avaliadas quanto ao cheiro, sabor, coloração e turbidez e, em intervalos

maiores, submetidas a uma análise mais completa, incluindo, exames microbiológicos (SILVA, 2005a).

A análise microbiológica da água foi satisfatória, não apresentando contagem de coliformes totais, fecais e bactérias heterotróficas (Tabela 5).

A água analisada está de acordo com o padrão industrial, e pode ser utilizada no processo cervejeiro.

Tabela 5 – Contagem de coliformes totais, fecais e bactérias heterotróficas.

Microorganismo	amostra (água)
Coliformes totais (UFC/mL)	Ausente
Coliformes fecais (UFC/mL)	Ausente
Bactérias heterotróficas (UFC/mL)	Ausente

3.2. Clarificação do caldo de cana

O caldo de cana que foi submetido ao tratamento conforme o estabelecido por Prati e Moretti (2002), chamado neste trabalho de clarificação parcial, apresentou-se límpido, porém com coloração escura e manteve a concentração de açúcares inalterada, ou seja, após o procedimento, o teor de sólidos solúveis medido em °Brix permaneceu inalterado.

A Figura 4, que representa o método segundo Prati e Moretti (2002), mostra o caldo cru, antes do tratamento (a), as impurezas retidas após o procedimento (b), o caldo após o tratamento (c) e o caldo concentrado a 65°Brix à direita, em comparação com um caldo cru concentrado sem o tratamento da clarificação parcial (d).

Figura 4 – Caldo de cana cru (a); impurezas retidas após a filtração do caldo no procedimento de clarificação parcial (b); caldo de cana após o tratamento de clarificação parcial (c) e comparação do caldo de cana cru (à esquerda) com o caldo submetido ao tratamento da clarificação parcial (direita), ambos concentrados à 65°Brix (d), segundo Prati e Moretti (2002).

Fonte: Arquivo pessoal.

No outro método de clarificação testado, conforme metodologia descrita pelo Consecana (2006), o caldo de cana ficou totalmente clarificado, porém a filtração demorou muito, além de utilizar muita quantidade de reagentes, e também gerou muito resíduo. Pensando em escala de bancada é possível de ser feito, porém em escala piloto e até mesmo industrial não seria viável. O teor de sólidos solúveis também permaneceu o mesmo após o procedimento.

A Figura 5, que representa o método segundo Consencana (2006), mostra o caldo de cana logo após a adição dos reagentes para a clarificação (a), a filtração do caldo de cana (b); impurezas retidas do caldo obtido após a filtração (c), a comparação do caldo cru com o caldo submetido ao tratamento da clarificação (d) e o caldo de cana concentrado (e).

Figura 5 – Caldo de cana com adição dos reagentes para a clarificação (a); filtração do caldo de cana (b); resíduo da filtração do caldo de cana clarificado (c); comparação do caldo cru (à esquerda) com o caldo submetido ao tratamento da clarificação (d) e caldo de cana concentrados à 65°Brix (e), segundo Consencana (2006).

Fonte: Arquivo pessoal.

Os dois procedimentos buscaram a remoção de partículas sólidas, já que segundo Braga (2006), as impurezas do caldo de cana são fontes de infecções, causando desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis. No entanto, é preciso lembrar que o caldo ou melado é adicionado na etapa de fervura no processo de elaboração da cerveja, por isso, possíveis contaminações podem ser eliminadas.

3.3. Acompanhamento da concentração do mosto na etapa de mosturação

A mistura do malte moído com água em temperatura controlada teve por objetivo solubilizar substâncias do malte diretamente solúveis em água e, com o auxílio das enzimas presentes no malte e liberadas no meio, solubilizar substâncias normalmente insolúveis, promover a gelatinização e a posterior hidrólise do amido em açúcares.

Deste modo, amostras foram coletadas no decorrer da mosturação visando avaliar a concentração de extrato do mosto total (°P) em função do tempo e temperatura conforme apresentadas na Figura 6.

Figura 6 – Concentração de extrato do mosto (°P), em diferentes temperaturas, ao longo do processo de mosturação.

Fonte: Arquivo pessoal.

Como verificado na Figura 6, pode-se observar que a concentração de extrato do mosto aumentou durante todo o processo de mosturação, principalmente durante o intervalo de temperatura correspondente ao intervalo de 52°C a 63°C.

É na condição próxima à 63°C que ocorre em maior intensidade a ação das enzimas dextrinase e β -amilase, provocando a decomposição do amido para maltose e maltotriose pelo rompimento das ligações α -1,6 e também a decomposição do amido para maltose pelo rompimento das ligações α -1,4, respectivamente (SILVA, 2005).

Após esta etapa, foi verificada uma desaceleração no aumento da concentração de extrato do mosto e o término da etapa de mosturação. Essa desaceleração ocorreu devido à inativação da enzima dextrinase, a qual possui baixa temperatura ótima de ação e é rapidamente desativada em temperaturas acima de 60°C, com consequente desaceleração da hidrólise do amido.

Em relação às enzimas, sabe-se que o grão de cevada possui β -amilase, enzima sacarificante que ataca dextrinas e amido solúvel nas extremidades das cadeias não redutoras, hidrolisa as penúltimas ligações α -1,4 e origina principalmente o dissacarídeo maltose. Na germinação da cevada forma-se a α -amilase, enzima com capacidade de liquefazer o amido por ataque das ligações α -1,4 glicosídicas, ao acaso. A mobilização das proteínas de reserva do endosperma é feita na germinação graças à atividade de proteinases

e peptidases. As proteinases são sintetizadas na camada de aleurona, que envolve o endosperma, e excretadas para o endosperma, onde estão as proteínas de reserva. A β -glucanase atua também nesta fase, degradando as β -glucanase da cevada, que vão conferir viscosidade ao mosto futuro (CRUZ, 2007).

3.4. Atenuação limite – Grau de fermentação final do mosto

No presente trabalho, foi feito um teste de atenuação limite para se ter noção do tempo final de fermentação verificando o extrato aparente final.

Extrato aparente corresponde à concentração dos sólidos solúveis (sendo os açúcares em sua maioria), desconsiderando a variação da densidade pelo etanol formado no meio (MATOS et al., 2009).

Em um estudo de Matos et al. (2009), o tempo final de cada fermentação estudada foi determinado quando se alcançou um valor de extrato aparente ($^{\circ}\text{P}$) aproximadamente igual a 1°P acima da concentração de açúcares não fermentáveis do ensaio do ponto final.

Já segundo Andrade (2007), o fim das análises da fermentação foi determinado quando 70% de atenuação do extrato foi alcançada ou ainda considerou-se como tempo final o tempo de fermentação com 1°P residual de açúcares fermentáveis.

O teste foi feito com mostos puro malte; 75% malte e 25% caldo de cana e 50% malte e 50% caldo de cana, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, com uma concentração de extrato original de 16°P .

Também foi realizado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB02 no mosto puro malte com uma concentração de extrato original de 16°P .

Após a retirada de amostras, a partir de 30 horas de crescimento foi verificada a atenuação limite, ou seja, o valor do extrato aparente que sobra no mosto no fim da fermentação (Tabela 6). Esse conteúdo de açúcar não é mais fermentescível.

Tabela 6 – Valores obtidos após a fermentação de 30 horas de mosto puro malte; 75% malte e 25% caldo de cana e 50% malte e 50% caldo de cana (*Saccharomyces cerevisiae* PPB01) e mosto puro malte (*Saccharomyces cerevisiae* PPB02), todos na concentração original de 16°P.

	PPB01			PPB02
	Puro Malte	75% malte + 25% caldo	50% malte + 50% caldo	Puro malte
Extrato aparente (°P)	2,14	1,84	1,20	5,11
Grau aparente de fermentação (%)	84,19	89,60	89,41	69,05

A atenuação limite indica o teor de extrato final da fermentação do mosto (ANDRADE, 2007), e a partir da Tabela 6, consideramos que a atenuação limite ocorreu quando o teor de extrato ficou em torno de 2,14°P para mosto puro malte, 1,84°P para mosto com 25% de caldo de cana e 1,20°P para mosto com 50% de caldo de cana, todos pela ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01.

Os valores do grau aparente de atenuação também encontram-se acima de 70%, que segundo Andrade (2007), determina o fim das análises da fermentação.

Já para mosto puro malte e uso da *Saccharomyces cerevisiae* PPB02, a atenuação limite ocorreu em 5,11°P e o grau aparente de fermentação atingiu um valor muito próximo à 70%.

3.5. Cor das cervejas

A Tabela 7 mostra os valores de cor para todas as cervejas elaboradas no presente estudo, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01.

Tabela 7 – Valores de cor para cervejas puro malte e com adição de diferentes proporções de caldo ou melado de cana, sem tratamento e com tratamentos de clarificação.

Proporção	Tratamento	Cor (EBC)
PM	-	13,30 ± 0,05
25M	parcialmente clarificado *	7,11 ± 0,10
25M	clarificado **	6,70 ± 0,07
25M	cru (sem tratamento)	10,49 ± 0,03
25C	parcialmente clarificado *	6,12 ± 0,03
25C	clarificado **	5,11 ± 0,05
25C	cru (sem tratamento)	5,90 ± 0,04
50M	parcialmente clarificado *	6,60 ± 0,08
50M	clarificado **	5,03 ± 0,15
50M	cru (sem tratamento)	12,56 ± 0,05
50C	parcialmente clarificado *	5,70 ± 0,04
50C	clarificado **	4,07 ± 0,06
50C	cru (sem tratamento)	4,57 ± 0,02

PM: cerveja elaborada com 100% malte (puro malte); 25M: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; 25C: cerveja elaborada com 25% de caldo de cana; 50M: cerveja elaborada com 50% de melado de cana; 50C: cerveja elaborada com 50% de caldo de cana. * Segundo Prati e Moretti, 2002; ** Segundo Consecana, 2006.

Verifica-se que a cerveja puro malte foi a que se apresentou mais escura comparada às demais, seguida das cervejas com adição de 50% e 25% de melado de cana, respectivamente, ambas sem tratamento prévio.

As cervejas elaboradas com caldo ou melado de cana com tratamento denominado “clarificado” apresentaram colorações mais claras.

A fim de uma comparar com cervejas comerciais, na Tabela 8, estão apresentados valores de cor de 5 cervejas comerciais do estilo Pilsen do tipo clara.

Tabela 8 – Valores de cor de cervejas comerciais tipo clara.

Cervejas comerciais	Cor (EBC)
Marca A	5,50
Marca B	5,75
Marca C	5,80
Marca D	5,75
Marca E	6,03

Com exceção da cerveja com adição de 25% de melado clarificado, as demais cervejas com tratamento de clarificação apresentaram valores de cor abaixo daqueles apresentados pelas cervejas comerciais.

As cervejas com adição de melado são mais escuras do que as cervejas com adição de caldo de cana, quando se compara cervejas com a mesma proporção de caldo ou melado.

Uma explicação para isso pode ser devido à elevada presença de melanoidinas formadas na concentração do caldo de cana para obtenção do melado, que altera a coloração final da cerveja. Segundo Plavsic, Cosovic e Lee (2006), as melanoidinas são produtos de coloração escura, formados pela condensação de açúcares e aminoácidos por uma reação não enzimática chamada reação de Maillard.

Essas melanoidinas dão cor e muito provavelmente são responsáveis pela coloração escura nas cervejas que utilizam melado de cana, principalmente quando utiliza o melado que não foi clarificado.

Também se verifica que as cervejas com adição de 25% de caldo de cana são mais escuras do que as com 50% de caldo em sua composição. O mesmo é verificado para as cervejas com adição de melado, que são mais escuras com a proporção de 25%, exceto quando foi usado melado cru.

3.6. Estudo de fermentações de mostos com 100% malte

Em geral, para qualquer processo fermentativo a principal transformação é a conversão dos açúcares em etanol e CO₂, obtida no metabolismo da fonte de carbono pelo micro-organismo utilizado. A forma mais usual de acompanhamento deste processo é por observações realizadas nas seguintes variáveis: consumo de substrato, formação de produto e concentração de células (SILVA, 2005).

Desse modo, dois processos cervejeiros com concentração de mosto de 16°P proveniente de 100% de malte de cevada e temperatura de fermentação de 12°C foram realizados, com um volume de 1000 mL, utilizando duas diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PPB01 e PPB02, a fim de verificar o processo fermentativo.

3.6.1. Fermentação de mosto puro malte pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01

A Figura 7 apresenta a evolução da concentração de extrato original do mosto, da concentração de etanol e do pH em um mosto com concentração de 16°P, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, e temperatura de fermentação de 12°C.

Figura 7 – Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (%v/v) e pH durante a fermentação de mosto 100% malte (16°P/12°C) utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01.

Fonte: Arquivo pessoal.

Verifica-se que ocorreu redução nos valores de pH ao longo das horas, iniciando com 5,30, diminuindo logo no início e atingindo valores na faixa de 4,19.

Da mesma forma, em um estudo com mostos puro malte e com adição de malte de sorgo e de painço, o pH também teve uma queda ao longo do processo fermentativo, caindo de 5,4 para 4,0 (AGU, 1995).

A redução no pH ao longo do processo fermentativo é decorrente da produção de ácidos orgânicos, como ácido lático, acético e succínico (BORZANI; AQUARONI; LIMA, 1983). A faixa de pH de 3,89 a 4,57, durante o processo de fermentação é suficiente para permitir uma rápida fermentação alcoólica e inibir bactérias indesejáveis (ALMEIDA et al., 2006).

Na Figura 7, também se observa um comportamento típico de fermentação alcoólica, com consumo de substrato nas primeiras horas e de formação do produto (etanol).

Pode-se observar na Figura 8, a concentração celular feita por meio da contagem de células em suspensão com auxílio de câmara de Neubauer, expressa em células/mL e valores de viabilidade celular.

A multiplicação celular foi mais rápida na fase inicial do processo já que nesse momento ainda havia concentrações de oxigênio e por isso as células estavam em alta atividade celular fazendo respiração. Em 84 horas, verifica-se a concentração celular mais elevada ($2,77 \times 10^7$ cel/mL) com subsequente queda. Esta queda ocorreu pela sedimentação das leveduras à medida que o extrato foi sendo consumido ao longo do processo fermentativo.

Os valores de viabilidade celular mantiveram-se elevados ao longo de toda a fermentação, atingindo aproximadamente 98% ao final do processo.

Figura 8 – Crescimento celular (10^7 células/mL) e viabilidade durante o processo fermentativo em mosto com 16°P, 100% malte, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, a 12°C.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nas primeiras horas de fermentação, observa-se uma curta fase de latência ou fase lag, que se dá imediatamente após a inoculação do meio com a levedura. Trata-se de um período de adaptação durante o qual a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio. Esta fase é acrescida de um período de transição, que se observa o início da reprodução microbiana propriamente dita. Assim, há um aumento gradual tanto da velocidade de reprodução quanto da velocidade específica de crescimento. No fim desse período, a população inteira de leveduras começa a se dividir em um intervalo regular médio de tempo (HISS, 2001).

Após 88 horas de fermentação, observou-se uma queda gradual da concentração das leveduras em suspensão com o decorrer do tempo. Nesse mesmo momento, verifica-se uma leve queda na viabilidade celular, e que ao final atinge 97,90% com 272 horas finais do estudo. As células mortas se depositam no fundo do fermentador e o valor da concentração celular diminui a uma velocidade que excede a velocidade de formação de novas leveduras.

Durante o declínio do número de células, ocorre uma lise celular, autólise ou rompimento das leveduras, provocado pela ação de enzimas intracelulares. Nesta fase ocorre a floculação das leveduras no mosto cervejeiro e esta floculação tem início quando já não se tem mais glicose no meio (ENGASSER, 1981).

A Figura 9 mostra a produtividade em álcool, que apresentou uma variação ao longo de todo o processo e alcançou o maior valor com 80 horas de fermentação com um valor de produtividade correspondente a 0,46 g/L.h, e foi diminuindo ao longo do tempo. Nesse mesmo período, obteve-se um fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) de 0,37 g/g, com uma leve queda logo em seguida, e aumentando muito pouco nas últimas horas.

O grau aparente de fermentação (GAF) referente a esta etapa (80 h) foi de 58,55%, valor este, abaixo do intervalo de 68% a 75%, conforme verificado em SENAI (1997) para o início da etapa de maturação, ou seja, do fim da fermentação. No entanto, com 68,90% de GAF, a produtividade era de apenas 0,27 g/L.h e um rendimento de 0,36 g/g.

No momento de maior produtividade (0,46 g/L.h), ainda existia extrato a ser fermentado (6,96°P), que não pode ser perdido. Já com 168 horas, GAF de 68,90% (similar ao que o teste de atenuação limite sugeriu para mosto 100% malte) tinha 4,67°P de extrato residual em 7 dias de fermentação, o que está de acordo com Silva (2005), que diz que a fermentação de cervejas do tipo *lager* deve ser feita de 7 a 15°C e de 7 a 10 dias.

Figura 9 – Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação do mosto com 16°P e 12°C, contendo 100% de malte.

Fonte: Arquivo pessoal.

A produtividade diminuiu após atingir seu valor máximo, mas isso não é problemático, visto que para a produção de cerveja não é necessário obter elevados valores de produtividade, assim como é para bebidas que serão destiladas. Além disso, não é interessante interromper a fermentação no momento de maior produtividade, visto que ainda continha uma quantidade de extrato a ser utilizado.

3.6.2. Fermentação de mosto puro malte pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB02

A Figura 10 apresenta a evolução da concentração de extrato do mosto, da concentração de etanol e do pH em um mosto com concentração de 16°P, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB02, e temperatura de fermentação de 12°C.

Figura 10 – Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (%v/v) e pH durante a fermentação de mosto 100% malte (16°P/12°C) utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB02.

Fonte: Arquivo pessoal.

Assim como ocorreu com o uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01 no item anterior, verifica-se o consumo de substrato com a produção de etanol durante a fermentação e também a queda nos valores de pH, iniciando com 5,86, diminuindo logo no início e atingindo valores na faixa de 4,29.

Na Figura 11, observa-se que o comportamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB02 foi diferente da levedura PPB01 em relação ao crescimento celular.

A análise foi conduzida até às 232 horas a fim de atingir um valor próximo ao encontrado no teste de atenuação limite, ou seja, de 5,11°P de extrato aparente.

Figura 11 – Crescimento celular (10^7 células/mL) e viabilidade durante o processo fermentativo em mosto com 16°P, 100% malte, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB02, a 12°C.

Fonte: Arquivo pessoal.

No início da fermentação, houve um leve aumento com uma posterior queda na concentração celular; no entanto, essa queda é normal, visto que se trata de um período de adaptação durante o qual a célula sintetiza enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio (MATOS et al., 2009).

Após as primeiras 40 horas verificou-se novamente um crescimento celular, atingindo o maior valor de células em suspensão ($3,17 \times 10^7$ cel/mL) em 96 horas. Logo em seguida apresentou novamente queda do número de células.

A viabilidade celular permaneceu em 100% até às 152 horas, sofrendo leve redução, e atingindo o valor de 98,40% nas 232 horas finais da fermentação.

De acordo com a Figura 12, o uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB02 não foi eficaz em termos de produtividade em álcool, que apresentou valores baixos ao longo de todo o processo fermentativo, atingindo o maior valor de 0,19 g/L.h com 104 horas de fermentação e um fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) de 0,29 g/g.

O rendimento foi maior (0,36 g/g) com 152 horas, com uma produtividade também de 0,19 g/L.h. O grau aparente de fermentação (GAF) referente a esta etapa (152 h) foi de 44,32%, bem abaixo do intervalo de 68% a 75%, conforme verificado em SENAI (1997) para o início da etapa de maturação.

Figura 12 – Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB02, durante a fermentação do mosto a 16°P e 12°C, contendo 100% de malte.

Fonte: Arquivo pessoal.

3.7. Estudo de fermentações de mostos com caldo de cana ou melado como adjunto

Durante a execução desta etapa do trabalho, foi realizado um total de 8 ensaios variando a quantidade de caldo de cana ou melado. As condições de temperatura para todos os ensaios foram afixadas em 12°C e um extrato original do mosto de 16°P.

Os Ensaios de 1 a 4 foram realizados com uma proporção de 75% de extrato de malte e 25% de caldo de cana ou melado e os Ensaios de 5 a 8 a uma proporção de 50% de extrato de malte e 50% de caldo de cana ou melado, com tratamento de clarificação parcial do adjunto ou não.

Em todos os ensaios, foi utilizada a levedura cervejeira *Saccharomyces cerevisiae* PPB01.

Houve variação do tempo final de fermentação entre os experimentos, que foi ao redor de 170 horas. As fermentações dos ensaios 2 e 6, ambos com adição de melado cru, tiveram sua atenuação muito rápida e levou somente 132 horas para terminar o processo.

Todos os ensaios apresentaram um “perfil” similar de fermentação, com consumo de extrato ao longo do tempo e formação de etanol. O pH foi decaindo ao longo da

fermentação e o crescimento celular atingiu um valor máximo, com subsequente queda. A viabilidade celular foi diminuindo durante o processo fermentativo.

As Figuras 13 e 14 apresentam um comparativo da evolução da concentração de extrato ao longo das fermentações sendo a Figura 13 para os Ensaios de 1 a 4 e a Figura 14 para os Ensaios de 5 a 8.

Figura 13 – Concentração de extrato (°P) em função dos tempos de fermentação para Ensaio 1 (melado parcialmente clarificado), Ensaio 2 (melado cru), Ensaio 3 (caldo parcialmente clarificado), Ensaio 4 (caldo cru), na proporção de 75% de malte e 25% de caldo de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 13, observa-se que os Ensaios 3 e 4 foram muito similares em relação ao consumo de extrato ao longo de todo o processo fermentativo.

O Ensaio 1, no qual foi adicionado adjunto submetido ao processo de clarificação parcial, no caso o melado, levou um tempo maior para reduzir a quantidade de extrato.

Na Figura 14, observa-se uma similaridade no consumo de extrato para os Ensaios 6, 7 e 8. Já o Ensaio 5, assim como o Ensaio 1 na figura anterior, também com a utilização de melado parcialmente clarificado, levou um tempo maior para reduzir a quantidade de extrato.

Figura 14 – Concentração de extrato (°P) em função dos tempos de fermentação para Ensaio 5 (melado parcialmente clarificado), Ensaio 6 (melado cru), Ensaio 7 (caldo parcialmente clarificado) e Ensaio 8 (caldo cru), na proporção de 50% de malte e 50% de caldo de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 15 são apresentadas as curvas que representam os teores de etanol (% v/v) ao longo do tempo de fermentação para os Ensaios 1 a 4.

Figura 15 – Concentração de etanol % (v/v) em função dos tempos de fermentação para Ensaio 1 (melado parcialmente clarificado), Ensaio 2 (melado cru), Ensaio 3 (caldo parcialmente clarificado), Ensaio 4 (caldo cru), na proporção de 75% de malte e 25% de caldo de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com a Figura 15, pode-se notar que os Ensaios 3 e 4 foram os que produziram os maiores teores de álcool. Já o Ensaio 2 foi o que apresentou menor teor alcóolico no tempo de fermentação de 128 h e o Ensaio 1 levou um tempo maior para aumentar significativamente sua produção de álcool.

O melado de cana para ser concentrado, sofre reação de Maillard, onde aminoácidos reagem com açúcares redutores, tornando esses nutrientes indisponíveis para as leveduras, afetando a produção de álcool. Isso pode explicar o motivo dos Ensaios 1 e 2, que são os com adição de caldo, produzirem níveis menores de etanol comparado com os Ensaios 3 e 4 (produzidos com melado).

Os Ensaios 3 e 4 tiveram uma produção similar de etanol desde o início da fermentação e os Ensaios 1 e 2 levaram um tempo maior para produzir álcool, e somente no final, é que atingiram níveis maiores.

Na Figura 16 são apresentadas as curvas que representam os teores obtidos de etanol ao longo da fermentação para os Ensaios de 5 a 8, no mosto com a proporção de 50% de caldo de cana ou melado.

Figura 16 – Concentração de etanol % (v/v) em função dos tempos de fermentação para Ensaio 5 (melado parcialmente clarificado), Ensaio 6 (melado cru), Ensaio 7 (caldo parcialmente clarificado) e Ensaio 8 (caldo cru), na proporção de 50% de malte e 50% de caldo de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Da mesma forma que no gráfico anterior, os ensaios contendo caldo de cana (7 e 8) se comportaram de maneira similar, com produção de etanol desde o início da

fermentação, com teores de etanol maiores do que os ensaios obtidos com melado (Ensaio 5 e 6).

Os Ensaio 5 e 6 também levaram um tempo maior para produzir etanol, assim como no gráfico anterior, principalmente o Ensaio 5, que ao final, atingiu os níveis mais baixos de álcool em relação aos demais ensaios.

O Ensaio 8 foi o que apresentou a maior formação de etanol, embora os demais ensaios tenham apresentado um perfil bem similar na produção do álcool de interesse no instante final.

Como já dito anteriormente, o grau aparente de fermentação (GAF) deve estar no intervalo de 68% a 75%, conforme verificado em SENAI (1997) para o início da etapa de maturação, ou seja, do fim da fermentação.

Nas Figuras 17 e 18 verifica-se o GAF dos ensaios realizados e observa-se que os ensaios com uso de caldo de cana atingem os maiores valores mais rapidamente. Porém, não há interesse em se fermentar uma cerveja em tão pouco tempo, pois não é somente a produção de etanol que se espera em uma cerveja.

Figura 17 – Grau Aparente de Fermentação (%) em função dos tempos de fermentação para Ensaio 1 (melado parcialmente clarificado), Ensaio 2 (melado cru), Ensaio 3 (caldo parcialmente clarificado), Ensaio 4 (caldo cru), na proporção de 75% de malte e 25% de caldo de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 18 – Grau Aparente de Fermentação (%) em função dos tempos de fermentação para Ensaio 5 (melado parcialmente clarificado), Ensaio 6 (melado cru), Ensaio 7 (caldo parcialmente clarificado) e Ensaio 8 (caldo cru), na proporção de 50% de malte e 50% de caldo de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

3.8. Produtividade volumétrica em etanol (Q_p) e rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) dos ensaios

Os dados experimentais foram analisados a fim de se avaliar a influência das diferentes proporções de caldo ou melado de cana e malte e também da ação da clarificação parcial dos adjuntos na produtividade volumétrica em etanol e rendimento a fim de avaliar as condições que permitiram obter uma cerveja de qualidade em um menor tempo de processo.

A Tabela 9 apresenta os maiores valores de produtividade e rendimento para os ensaios com mosto 100% malte para as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PPB01 e PPB02.

Tabela 9 – Produtividade e rendimento nos respectivos tempos obtidos nos ensaios utilizando mosto 100% malte pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PPB01 e PPB02.

	PPB01	PPB02
Produtividade (g/L.h)	0,46 ^a	0,19 ^b
Y _{P/S} aparente (g/g)	0,37 ^a	0,29 ^b
Eficiência (%)	76,46	59,93
Tempo (horas)	80	104

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nota-se na Tabela 9 que para os mostos puro malte, as fermentações apresentaram valores de produtividades mais baixos que mostos com adição de caldo ou melado de cana, presentes na Tabela 10.

O Y_{P/S} com uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01 foi maior, com rendimento de 0,37 g/g. No entanto, com a levedura PPB02, tanto a produtividade, quanto o rendimento foram muito baixos, com destaque no tempo de fermentação que ainda foi mais elevado.

A Tabela 10 apresenta os maiores valores de produtividade e rendimento para os Ensaios 1 a 4, que contem proporção de 75% de extrato de malte e 25% de caldo ou melado de cana.

Tabela 10 – Produtividade e rendimento nos respectivos tempos obtidos nos Ensaio de 1 a 4.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
Produtividade (g/L.h)	0,54 ^b	0,50 ^b	0,86 ^a	0,80 ^a
Y _{P/S} aparente (g/g)	0,43 ^a	0,30 ^b	0,35 ^b	0,35 ^b
Eficiência (%)	88,86 ^a	62,00 ^c	72,33 ^b	72,33 ^b
Tempo (horas)	88	56	40	48

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A partir desses valores, verifica-se que as maiores produtividades ocorreram quando foi usado caldo de cana (Ensaios 3 e 4) e não com o melado (1 e 2) como adjunto. Além disso, os maiores valores de produtividades foram obtidos com menor tempo de fermentação.

O maior rendimento ocorreu no Ensaio 1, porém, com 88 horas de fermentação.

Para os Ensaios 5 a 8, que contem proporção de 50% de extrato de malte e 50% de caldo de cana ou melado, os valores são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 – Produtividade e rendimento nos respectivos tempos obtidos nos Ensaio de 5 a 8.

	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8
Produtividade (g/L.h)	0,44 ^c	0,62 ^b	0,86 ^a	0,84 ^a
Y _{P/S} aparente (g/g)	0,39 ^a	0,36 ^a	0,39 ^a	0,40 ^a
Eficiência (%)	80,60 ^a	74,40 ^b	80,60 ^a	82,66 ^a
Tempo (horas)	88	72	56	48

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Assim como nos ensaios anteriores, as maiores produtividades também ocorreram nos ensaios com adição de caldo de cana, no caso, Ensaios 7 e 8.

Andrietta e Stuppiello (1990) verificaram valores na faixa de 0,445 g/g ao estudarem a fermentação alcoólica apenas de caldo de cana, similar ao valor encontrado no Ensaio 1, que no caso continha como adjunto melado de cana parcialmente clarificado.

Para uma análise geral dos dados obtidos, verifica-se na Tabela 12 um comparativo geral do tempo de fermentação, extrato aparente final (°P), teor final de etanol (%v/v), maior número de células (cel/mL) e o tempo em que isso aconteceu, maior valor de produtividade volumétrica (g/L.h) e rendimento (g/g), também no tempo que isso aconteceu, entre os 8 ensaios realizados.

Tabela 12 – Comparação dos principais fatores da fermentação.

Ensaio	Tempo final de fermentação (h)	Extrato aparente final (°P)	Álcool final (% v/v)	Células (cel/mL)	Tempo * (h)	Maior produtividade volumétrica (g/L.h)	Rendimento (g/g)	Tempo ** (h)
1 - 25MPC	176	1,89	7,34	$4,71 \times 10^7$	80	0,54	0,43	80
2 - 25MC	128	2,59	5,70	$9,02 \times 10^7$	64	0,5	0,30	56
3 - 25CPC	160	2,08	6,98	$7,38 \times 10^7$	48	0,86	0,35	40
4 - 25CC	176	2,09	6,91	$11,30 \times 10^7$	48	0,8	0,35	48
5 - 50MPC	176	1,98	7,45	$5,56 \times 10^7$	80	0,44	0,39	88
6 - 50MC	128	1,62	6,94	$9,95 \times 10^7$	64	0,62	0,36	72
7 - 50CPC	160	1,70	7,15	$7,68 \times 10^7$	48	0,86	0,39	56
8 - 50CC	176	1,58	8,04	$11,90 \times 10^7$	48	0,84	0,40	48

25MPC: cerveja elaborada com 25% de melado parcialmente clarificado; 25MC: cerveja elaborada com 25% de melado cru; 25CPC: cerveja elaborada com 25% de caldo parcialmente clarificado; 25CC: cerveja elaborada com 25% de caldo de cana cru; 50MPC: cerveja elaborada com 50% de melado parcialmente clarificado; 50MC: cerveja elaborada com 50% de melado cru; 50CPC: cerveja elaborada com 50% de caldo parcialmente clarificado; 50CC: cerveja elaborada com 50% de caldo de cana cru. *Tempo em que houve o maior crescimento celular; **Tempo em que houve maior produtividade e rendimento.

Observa-se na Tabela 12 que os Ensaio 2 e 6 foram os que apresentaram menor tempo de fermentação (128 h).

O Ensaio 8 foi o que apresentou um menor teor de extrato aparente ao final da fermentação, visto que apresentava 50% de caldo de cana cru. Isso ocorreu, pois houve elevada adição de adjunto contendo muito extrato fermentescível, o que contribuiu para um consumo elevado do mesmo, restando uma pequena quantidade ao final do processo fermentativo.

Os maiores valores de células em suspensão foram encontrados nos Ensaio 4 e 8 em apenas 48 h de fermentação e nos Ensaio 6 e 2, no tempo de 64 h. Dessa forma, conclui-se que os valores mais elevados de células em suspensão obtidos foram encontrados nos ensaios contendo adjuntos cru, ou seja, sem passar pelo tratamento de clarificação parcial, principalmente quando utilizou-se caldo de cana.

O conteúdo de etanol foi maior nos ensaios em que se utilizou 50% de caldo ou melado de cana, visto que a cana contém muita sacarose, totalmente fermentada pela levedura ao longo do processo.

A Tabela 13 apresenta um comparativo de produtividade volumétrica (g/L.h), rendimento (g/g) e teor de etanol (% v/v) entre os ensaios nos tempos de 96 e 120 de fermentação. A escolha de 96 e 120 horas foi baseada na observação dos gráficos que se encontram no Apêndice D, visto que a partir de 120 horas a queda de extrato e a formação de etanol não foi mais tão significativa, e já atingiram o GAF entre 68 a 75%.

Tabela 13 – Comparação da produtividade volumétrica (g/L.h), rendimento (g/g) e teor de álcool em 96 e 120 horas de fermentação.

Ensaio	96 horas			120 horas		
	Produtividade volumétrica (g/L.h)	Rendimento (g/g)	Álcool % (v/v)	Produtividade volumétrica (g/L.h)	Rendimento (g/g)	Álcool % (v/v)
1 - 25MPC	0,49	0,41	6,00	0,44	0,38	6,66
2 - 25MC	0,46	0,33	5,55	0,37	0,32	5,64
3 - 25CPC	0,56	0,37	6,84	0,45	0,37	6,87
4 - 25CC	0,55	0,36	6,70	0,45	0,37	6,80
5 - 50MPC	0,42	0,35	5,07	0,41	0,38	6,22
6 - 50MC	0,55	0,35	6,71	0,46	0,35	6,93
7 - 50CPC	0,56	0,36	6,76	0,46	0,37	7,04
8 - 50CC	0,62	0,40	7,59	0,51	0,35	7,72

25MPC: cerveja elaborada com 25% de melado parcialmente clarificado; 25MC: cerveja elaborada com 25% de melado cru; 25CPC: cerveja elaborada com 25% de caldo parcialmente clarificado; 25CC: cerveja elaborada com 25% de caldo de cana cru; 50MPC: cerveja elaborada com 50% de melado parcialmente clarificado; 50MC: cerveja elaborada com 50% de melado cru; 50CPC: cerveja elaborada com 50% de caldo parcialmente clarificado; 50CC: cerveja elaborada com 50% de caldo de cana cru.

A partir da Tabela 13, verifica-se que de 96 horas para 120 horas ainda há um aumento na produção de etanol para a maioria dos ensaios, com valores praticamente constantes de rendimento.

Agora fazendo uma análise global dos ensaios, o uso de caldo de cana apresenta maiores valores de produtividade e rendimento. Os Ensaios 3, 7 e 8 foram os que tiveram maiores valores de produtividade.

Baseado na observação dos resultados obtidos ao longo da fermentação (APÊNDICE D), após 120 horas de fermentação, todos os ensaios continham um nível de álcool, que já tinha atingido praticamente seu máximo, e a partir desse momento, a sua

produção foi pouco significativa. Pode-se dizer então, que o tempo de fermentação dos ensaios realizados seria em torno de 5 dias.

Em um estudo utilizando malte de sorgo e de painço como adjunto, e uma temperatura de fermentação de 11°C, próxima a do presente estudo, a fermentação primária estava completa após 5 dias (AGU, 1995).

Para cervejas do tipo *lager*, que é o tipo de cerveja do presente trabalho, a fermentação ocorre de 7 a 15°C, por 7 a 10 dias. No entanto, as fermentações aqui executadas, foram conduzidas a 12°C e tiveram uma produção de etanol em um tempo menor, em torno de 5 dias.

Dragone et al. (2003) relataram que os cervejeiros tem utilizado aumentos de temperatura para elevar a velocidade de fermentação, e com isso, diminuir o tempo total do processo. No presente trabalho, as fermentações foram realizadas na temperatura de 12°C, que é considerada baixa, mas, verificou-se que a velocidade de fermentação foi rápida em todos os experimentos.

A concentração inicial de açúcares dos mostos do estudo em questão pode ter contribuído na elevada produção de etanol, visto que continha um extrato original de 16°P. O aumento na produção de etanol com uma elevada concentração inicial de substrato no mosto cervejeiro foi verificado por vários autores (CUNNINGHAM; STEWART, 1998; DRAGONE et al., 2003; MCCAIG et al., 1992; SILVA, 2005; CARVALHO, 2009).

No entanto, observa-se pelo relato desses autores, que o aumento da concentração inicial de açúcares ocasiona um aumento no tempo necessário para o aparecimento considerável de etanol no meio, o que difere do presente estudo.

Dessa forma, pode-se afirmar que a sacarose proveniente do caldo de cana, utilizada como fonte de carbono pela levedura, tornou-se o principal fator que influenciou de maneira positiva na obtenção de boa produtividade de etanol.

Como o caldo de cana adicionado é rico em sacarose, e a levedura apresenta a enzima invertase que converte a sacarose em moléculas de glicose e frutose sendo rápida produção de etanol no início das fermentações, onde o mosto ainda estava aerado, pode ser explicada pelo efeito *Crabtree*. Segundo Bakker et al., (2001), *S. cerevisiae*, em presença de elevada concentração de glicose mesmo em condições estritamente aeróbias, possui metabolismo do tipo respiro-fermentativo. Esse comportamento metabólico é provocado por este efeito conhecido como efeito *Crabtree*. Esse efeito se pronuncia em condições onde a concentração de glicose ultrapassa um valor limite. O mecanismo responsável pela repressão catabólica pode ser bastante complexo, mas estudos mostram que ocorre

principalmente através do forte efeito repressivo da glicose sobre a atividade de enzimas respiratórias e também, possivelmente, pela inibição da expressão genética de enzimas constituintes da via respiratória, fazendo com que parte do piruvato que não pode ser oxidado pelo ciclo de Krebs, seja reduzido a etanol pelo processo fermentativo.

Em relação às quantidades de açúcares fermentescíveis no mosto de cevada e com caldo ou melado de cana, a maior diferença é encontrada no fato da cevada conter mais maltose (AGU; PALMER, 1998); e o caldo de cana conter maiores níveis de sacarose.

A sacarose, presente em grande quantidade no caldo de cana, primeiramente é dissociada fora da célula de levedura pela enzima invertase em glicose e frutose, para depois difundirem pela membrana celular e serem fermentadas em seu interior. Já a maltose e a maltotriose, que estão em proporções maiores em mosto 100% malte, são transportadas para o interior da célula pelas enzimas permeasse (maltose-permease e maltotriose permease), sendo dissociadas em glicose pela enzima maltase. No interior da célula, os açúcares primários, ou seja, os monossacarídeos serão transformados em álcool etílico, CO₂ e energia (REINOLD, 1997). Dessa forma, a utilização da sacarose pela levedura é mais rápida que a maltose e a maltotriose, motivo que pode ter acelerado a fermentação dos mostos com adição de caldo de cana.

Os maiores rendimentos dos ensaios com adição de 25% caldo de cana foram entre 0,30-0,43 g/g, já para os ensaios com adição de 50% de caldo de cana foram de 0,36-0,45 g/g. O valor de rendimento para mostos com 100% malte pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01 foi de 0,37 g/g e para a levedura PPB02 foi de 0,29 g/g.

Estima-se que 5 % do açúcar metabolizado pela levedura seja desviado para gerar produtos secundários da fermentação (glicerol, ácidos orgânicos, álcoois superiores, acetaldeído, acetoína, butilenoglicol e outros), resultando num rendimento de 95% em etanol, conforme já observado por Pasteur em condições adequadas de fermentação (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Por isso a eficiência dos processos do presente trabalho foram calculados em porcentagem, pois parte do açúcar metabolizado pela levedura cervejeira foi desviado para a geração de tais produtos secundários e comparados com o fator de conversão de extrato em produto, segundo Balling (0,4839 g/g). De acordo com esse autor, que realizou diversos estudos com mosto cervejeiro, 2,0665g de açúcar é convertido pela levedura em 1,0 g de etanol; 0,9595 g de CO₂ e 0,11 g de biomassa de levedura (REINOLD, 1997).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um micro-organismo anaeróbico facultativo, ou seja, em aerobiose, parte da glicose é transformada em biomassa, CO₂ e água e em

anaerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO₂, processo esse chamado de fermentação (BATISTA, 2005).

A glicose é convertida em piruvato pela glicólise, o piruvato é convertido em etanol e CO₂ em um processo com duas etapas. Na primeira etapa o piruvato sofre a descarboxilação em uma reação irreversível catalisada pela enzima piruvato descarboxilase. Essa reação é uma descarboxilação simples e não envolve a oxidação do piruvato. A enzima piruvato descarboxilase requer Mg⁺² e tem uma coenzima firmemente ligada, a tiamina pirofosfato, que age aumentando a tolerância da levedura ao etanol. Na segunda etapa, por ação da enzima álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol, com o NADH derivado da atividade da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fornecendo o poder redutor (NELSON; COX, 2002).

Porém, além de etanol e CO₂, há também formação de ácidos, álcoois alifáticos superiores, ésteres, diacetil e acetoína durante a fermentação. Dentre os ácidos orgânicos formados estão ácido acético, ácido fórmico, piruvato, malato, D-lactato, L-lactato e citrato, que tem como consequência a redução do pH em 0,8 – 1,2 unidades. O pH baixo aumenta a estabilidade microbiológica e torna o amargor mais agradável (REINOLD, 1997). Essa redução do pH foi observada em todos os ensaios realizados.

Carvalho e Zambiasi (2011) também observaram uma redução no pH ao longo do processo fermentativo de cerveja Pilsen, iniciando em 5,53 e reduzindo para 4,32.

Segundo HISS (2001), a duração da fase lag varia principalmente com a concentração do inóculo, ou seja, com a concentração celular inicial, com a idade do micro-organismo e com o seu estado fisiológico. No entanto, em todos os ensaios realizados, padronizou-se utilizar sempre a mesma quantidade de inóculo, com células novas e recém-cultivadas a partir da cultura estoque.

Todos os ensaios foram inoculados com uma concentração inicial de levedura na ordem de 10⁷ células/mL, pois segundo White e Zainasheff (2010) para a inoculação em cervejas do tipo *lager*, deve ser adicionado 1 milhão células de levedura, multiplicado pelo grau plato e pelo volume (em mililitros). Como no presente trabalho utilizou-se 1000 mL de mosto a 16°P, o inóculo inicial foi de 1,6 x 10⁷ células/mL.

Em um estudo que avaliou diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae* na ordem de 10⁶, em mosto cervejeiro puro malte, com fermentação conduzida a 12°C, foi verificado que o aumento na concentração de levedura de 1,0 x 10⁶ para 1,5 x 10⁶ por litro de mosto reduziu o tempo de fermentação da cerveja quando comparado com o período de fermentação de 64 horas do tratamento padrão (CARVALHO; ZAMBIAZI, 2011).

Normalmente utilizam-se concentrações de células viáveis na ordem de 10^6 a 10^8 células/mL para a produção de cerveja (ZUPPARDO, 2010). O aumento da concentração de levedura provoca pequenas alterações nas características da cerveja, além de reduzir o volume final de biomassa retirada após a fermentação (REINOLD, 1997).

O caldo de cana fresco, aqui chamado de caldo de cana cru, apresenta um *flavor* característico e constitui-se num produto perecível com vida útil muito curta entre a extração e o consumo, em função de sua rica composição química, sendo um meio adequado ao crescimento e desenvolvimento de micro-organismos. Após 24 horas, de armazenamento sob refrigeração, o caldo extraído apresenta sedimentação e sinais de alteração em suas características sensoriais, principalmente devido à fermentação e ao escurecimento enzimático (BHUPINDER; SHARMA; HARINDER, 1991; SIVASUBRAMANIAN; PAI, 1994; SANTOS, 2004). Além disso, as impurezas do caldo de cana são fontes de infecções, provocando desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis (BRAGA, 2006).

No entanto, para a execução do presente trabalho, o caldo extraído foi utilizado logo após a sua extração para a elaboração dos mostos. Além disso, após a mosturação, o mosto foi submetido à fervura, o que elimina possíveis contaminações presentes no caldo.

As bactérias lácticas e as leveduras apresentam baixa resistência térmica, sendo, geralmente destruídas quando submetidas ao processamento térmico (GERALDINI et al., 1979; THOMAS, 1996). Mas estes possíveis micro-organismos foram eliminados na etapa de fervura.

4. CONCLUSÕES

A qualidade da água utilizada para elaboração das cervejas foi satisfatória tanto físico-quimicamente quanto microbiologicamente, de acordo com o padrão industrial. Apenas o cálcio foi adicionado na proporção de 1,26 g/Kg de malte, no momento da mosturação.

Em relação à cor das cervejas, houve uma grande variação dos valores. As cervejas que apresentaram os maiores valores foram: puro malte; com adição de 50% de melado cru e com adição 25% de melado cru, respectivamente.

As cervejas elaboradas com caldo de cana, tanto com 25% quanto com 50% de adição, tiveram um consumo de extrato e uma produção de álcool mais rápida durante a fermentação quando comparadas com as cervejas com adição de melado.

A produtividade e o rendimento também foram maiores quando se utilizou o caldo ao invés do melado. O crescimento celular também atingiu maiores valores nas cervejas com caldo de cana.

O tratamento de clarificação parcial do caldo de cana não alterou o perfil de fermentação. E quando foi realizado o tratamento para o melado de cana, verificou-se que o processo fermentativo ficou mais lento.

Conclui-se que não é necessário fazer tratamento do caldo ou melado, já que isso acabaria aumentando gastos, gerando resíduos e consumindo um maior tempo de execução.

O caldo de cana de açúcar é uma matéria prima promissora para a produção de cerveja, pois apresenta a vantagem de ser considerado um substrato de baixo custo comercial para o processo fermentativo devido à abundância e facilidade de aquisição em nosso país.

Já o melado de cana é muito mais fácil trabalhar em comparação ao caldo, visto que o caldo após a sua extração, já deve ser utilizado. O melado pode ser armazenado por um tempo e não degrada como o caldo de cana.

Como se trata de um mosto concentrado, de 16°P, durante a maturação, ainda pode-se diluir a cerveja obtida, com água carbonatada para obter cerveja Pilsen comum (4,8 % v/v de etanol), gerando um maior volume de produção e, conseqüentemente a produtividade volumétrica.

REFERÊNCIAS

AGU, R. C. Comparative study of experimental beers brewed from millet, sorghum and barley malts. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1-3, 1995.

AGU, R. C.; PALMER, G. H. A reassessment of sorghum for larger beer brewing. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 253-261, 1998.

ALMEIDA, M. M.; TAVARES, D. P. S. A.; ROCHA, A. S.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H.; MOTA J. C. Cinética da produção do fermentado do fruto do mandacaru. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 8, n. 1, p. 35-42, 2006.

ANDRADE, C. M. **Obtenção de chope utilizando arroz preto (*Oryza sativa*) como adjunto de malte**. 2007. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena – SP, 2007.

ANDRIETTA, S. R.; STUPIELLO, J. P. Simulação e modelagem para processo de fermentação alcoólica (II) contínua. **Stab Açúcar, Álcool e subprodutos**. Piracicaba, v.9, p. 45-51, 1990.

AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS - **Methods of analysis of the american society of brewing chemists**. 8th Revised Edition. Minnesota: The Technical Committee and the Editorial Committee of the ASBC, 1996.

BAKKER, B. M.; OVERKAMP, K. M.; VAN MARIS, A. J. A.; KÖTTER, P.; LUTTIK, A. H.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Review**, v. 25, p. 15-37, 2001.

BATISTA, M. A. **Estudo da imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em gel de alginato de cálcio no processo de fermentação alcoólica**. 2005. 114f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2005.

BHUPINDER, K.; SHARMA, K. P.; HARINDER, K. Studies on the development and storage stability of ready to serve bottled sugarcane juice. **International Journal of Tropical Agriculture**, v. 9, n. 2, p. 128-134, 1991.

BRAGA, V. S. **A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para produção de cachaça.** 2006. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba - SP, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 julho de 1994. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 5 jun. 2009. Disponível em: <http://gpex.aduaneiras.com.br/gpex/gpex.dll/infobase/atos/decreto/decreto6871_09/dec%2006871_09_01.pdf> . Acesso em: 18/12/2014.

BRIGGS, D.E.; BOULTON, C.A.; BROOKES, P.A; STEVENS, R. *Brewing: science and practice.* U.S.A. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2004, p. 85-201. 2004.

BRUNELLI, L. T. **Produção de cerveja com mel: características físico-químicas, energéticas e sensorial.** 2012. 103f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Energia da Agricultura), Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu – SP, 2012.

BORZANI, W.; AQUARONI, E.; LIMA, U.A. **Engenharia Bioquímica**, São Paulo: Editora. 1983. V. 3.

BORZANI, W. Cinética de processos fermentativos. **Revista Brasileira de Engenharia**, v. 3, n. 2, p. 61, 1986.

CARVALHO, G. B. M. **Obtenção de cerveja usando banana como adjunto e aromatizante.** 2009. 163f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial - Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (USP), Lorena - SP, 2009.

CARVALHO, D. S.; ZAMBIAZI, R. C. Avaliação do processo fermentativo de cerveja pilsen pelo uso de diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae*. **Alimentos e Nutrição**, v. 22. n. 3, p. 351-357, 2011.

CONSECANA. Conselho dos Produtores de Cana de Açúcar, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo. **Manual de Instruções:** 5 ed. Piracicaba - SP, 2006. 112p.

CRUZ, J. M. M. Produção de cerveja. In: FONSECA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. **Reactores Biológicos:** fundamentos e aplicações. Lisboa/Porto: Lidel, 2007. p. 277-305.

CUNNINGHAM, S.; STEWART, G. G. Effects of high gravity brewing and acid washing on brewers' yeast. **Journal of the American Society of the Brewing Chemists**, v. 56, n. 1, p. 12-18, 1998.

DAUT, C. E. ; ALMEIDA, J. P.; ABREU, L. E. V.; BRUM, M. A. R. Determinação do conteúdo de Ca, Cu e Fe em cervejas consumidas em Santa Maria. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v. 4, n. 1, p. 57-62, 1974.

DIMAS, N. D. **Análise química da cerveja 2M em termos dos teores de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, e Zn e verificação da contribuição dos teores destes elementos a partir da água e do malte**. 2010. 45f. Trabalho de Licenciatura, Faculdade de Ciências, Departamento de Química, Maputo, 2010.

DRAGONE, G.; SILVA, D. P.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; LIMA, U. A. Improvement of the ethanol productivity in a high gravity brewing at pilot plant scale. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1171-1174, 2003.

ENGASSER, J. M.; MARC, I.; MOLL, M.; DUTEURTRE, B. Kinetic Modeling of Beer Fermentation. In: EUROPEAN BREWERY CONVENTION 18, 1981, Copenhagen.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **Analytica-EBC**. EBC Analysis Committee. Fachverlag Hans Carl. Nuremberg. 2000.

GERALDINI, A. M.; DELAZARI, I.; LEITÃO, M. F. F.; OLIVEIRA, C. M. M.; UBOLDI-EIROA, M. N. Caracterização de bactérias lácticas em alimentos. I. Avaliação de meios sólidos para contagens de culturas puras. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 53-64, 1979.

GIBSON, B. R. 125th Anniversary Review: Improvement of higher gravity brewery fermentation via wort enrichment and supplementation. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 117, n. 3, p. 268-284, 2011.

HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2. p. 93-122.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos/coordenador**. Odair Zenebon; Neus Sadocco Pascuet; Paulo Tiglea. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, Cap. 4 e 9.

LEWIS, M. J. Beer and brewing, KIRK Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 5 ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. 2004. v. 3, p. 561-589.

LIMA, U.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. v. 3. p. 01-46.

MAGALHÃES, P. J. C. R. **Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de xanto-humol e isoxanto-humol no lúpulo e na cerveja**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 2006.

MATOS, G. F.; TEIXEIRA, J. A.; SILVA, D. P.; VICENTE, A. A.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; CARVALHO, G. B. M. **Análise da fermentação em biorreatores cilíndricos de bancada na elaboração de cerveja com adjunto de banana**. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS NATAL/RN 17. 2 a 5 de Agosto de 2009.

MCCAIG, R.; MCKEE, J.; PFISTERER, E. A.; HYSERT, D. W., Very high gravity brewing-laboratory and pilot plant trials. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 50, p. 18-26, 1992.

MÉTODOS DE ANÁLISIS CERVECEROS. **Recompilación de métodos técnicos cervceros de la Comisión de Análisis de Europa Central (MEBAK)**. Caracas - Venezuela. 1999. 273p. Tradución de la tercera edición del original en alemán. Traducido y Editado por la Asociación Latinoamericana de Fabricantes de Cerveza (ALAFACE).

MEUSSDOERFFER, F.; ZARNKOW, M. Starchy Raw Material. In: EßLINGER, H.M. **Handbook of Brewing**. Weinheim, Germany: WILEY-VCH, 2009. p. 43-84

MOSER, A. Bioprocess technology. Kinetics and Reactors. New York: Springer-Verlag, 1988. 451p.

NABAIS, R. N.; CORREIA-SÁ, I.; VIEGAS, C. A.; NOVAIS, J. M. Influence of calcium ion on ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* and alcoholic fermentation by yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2439-2446, 1988.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: **Princípios de bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Editora Sarvier, São Paulo, SP, 2002. ISBN: 85-7378-125-4.

PLAVSIC, M.; COSOVIC, B.; LEE, C.; Copper complexing properties of melanoidins and marine humic material. **Science of the Total Environment**, v. 366, p. 310-319, 2006.

PRATI, P.; MORETTI, R.H. Desenvolvimento de processo para clarificação de caldo de cana para consumo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS 18., 2002. Porto Alegre.

PRESTES, G.; CORDEIRO, A. R. Tecnologia da fabricação de cerveja. In: SEMANA DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS 6. 2008. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR Campus Ponta Grossa - Paraná - Brasil ISSN: 1981-366X.

REINOLD, M. R. **Manual prático de cervejaria**. São Paulo: Aden, 1997. 214p.

SANTOS, R. C. Da beira da estrada às prateleiras. **Jornal da Universidade Estadual de Campinas**, v. 18, n. 250, p. 8, 2004.

SENAI. **Conheça a cerveja**. Rio de Janeiro: Setor de Documentação Bibliográfica do CENATEC de Produtos Alimentares do SENAI – DR/RJ, Vassouras, 1997.

SILVA, D. P. **Produção e avaliação sensorial de cerveja obtida a partir de mostos com elevadas concentrações de açúcares**. 2005. 177f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, 2005.

SILVA, J. B. A. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de bebidas**: matéria prima, processamento, BPF / APPCC, legislação e mercado. São Paulo: Edgar Blücher, 2005a. 550 p.

SIVASUBRAMANIAN, C. G.; PAI, J. S. Effect of heat treatments on the quality of sugarcane juice. **Indian Food Packer**, v. 48, n. 2, p. 51-54, 1994.

THOMAS, R. W. S. P. A microflora de produtos engarrafados. **Engarrafador moderno**, v. 7, n. 47, p. 69-74, 1996.

TIMBUNTAM, W.; SRIROTH, K.; TOKIWA, Y. Lactic acid production from sugar-cane juice by a newly isolated *Lactobacillus* sp. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 811-814, 2006.

WALKER, G. M., **Role of metal ions in brewing yeast fermentation performance**. In: BREWING yeast fermentation performance. 1ed., K. A. Smart, Oxford: Blackwell Science. 2000, p. 86-91.

WHITE, C.; ZAINASHEFF J. **Yeast**: the practical guide to beer fermentation, Colorado: Brewers publication, 2010. 304p.

ZUPPARDO, B. **Uso da goma oenogum para a estabilização coloidal e de espuma em cerveja**. 2010.115f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

CAPÍTULO 3 – ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL DE CERVEJAS COM ADIÇÃO DE CALDO OU MELADO DE CANA

1. INTRODUÇÃO

O *flavor* da cerveja compreende uma mistura complexa de substâncias, como por exemplo, fenóis, proteínas, carboidratos, iso-alfa-ácidos, álcoois, taninos, lactonas, aldeídos, compostos carbonílicos insaturados, dicetonas vicinais, ésteres, ácidos graxos, óleos essenciais, compostos voláteis contendo enxofre, nucleotídeos, íons minerais e ácidos orgânicos (SOHRABVANDI; MORTAZAVIAN; REZAEI, 2011).

Uma melhor compreensão desses compostos de aroma é de suma importância para a moderna tecnologia de fabricação de cerveja, quer seja para ajuda na seleção de matérias primas e nas linhagens de leveduras quanto para o controle de qualidade do produto final (SILVA; AUGUSTO; POPPI, 2008).

Mais de 800 agentes aromatizantes foram encontrados em cervejas e embora muitos destes compostos não sejam compostos chave de sabor, eles introduzem uma percepção que desempenha um papel importante na impressão global do sabor da cerveja (MUNROE, 1994; FANTOZZI et al., 1998).

O metabolismo da levedura tem uma contribuição importante para o *flavor* da cerveja e temperaturas mais elevadas aumentam a taxa de metabolismo da levedura, porém, uma mudança de temperatura será diferente para cada reação bioquímica, mudando o balanço dos compostos que originam o *flavor* (SOHRABVANDI; MORTAZAVIAN; REZAEI, 2011).

Avaliar o *flavor* e outras características físico-químicas de cervejas produzidas com adição de caldo ou melado de cana é interessante, principalmente utilizando cerveja puro malte como controle a fim de verificar a ação dos adjuntos na bebida final, ainda mais quando se quer produzir cervejas do tipo *lager*, que não devem ser muito ricas em aromas e sabores.

Produzir uma cerveja com adjunto, que pode baratear o processo e ainda manter a qualidade de uma cerveja puro malte é um grande desafio.

1.1. Componentes presentes na cerveja

Os principais componentes da cerveja são água, etanol e carboidratos fermentescíveis, isto é, frutose, glicose, maltose e maltotriose, que contribuem diretamente para a doçura de cerveja. Já os carboidratos maiores (com mais de quatro unidades glicosídicas) contribuem para o “corpo” da cerveja (NOGUEIRA et al., 2005).

Os ésteres voláteis estão em concentrações bem baixas em bebidas fermentadas tais como cerveja e vinho, mas são extremamente importantes para o perfil de sabor destas bebidas (VERSTREPEN et al., 2003).

Álcoois superiores constituem uma parte importante dos subprodutos formados durante a fermentação da cerveja, e provocam a sensação de “aquecimento” na boca, além de que sua formação é dependente da temperatura durante a fermentação (MEILGAARD; PEPPARD, 1986).

Dicetonas vicinais (diacetil e 2,3-pentanodiona) tem como característica dar à cerveja aromas e sabor de “manteiga”. Esses compostos tem um elevado potencial “*off-flavor*”, ou seja, de sabor desagradável, dependendo da temperatura (ŠMOGROVIČOVÁ; DÖMÉNY, 1999).

Os aminoácidos são as unidades das proteínas presentes nas matérias primas utilizadas para a produção de cerveja e, eles influenciam a atividade de enzimas proteolíticas dos cereais durante a mosturação, e também estão envolvidos na atividade dos micro-organismos durante o processo fermentativo, além de contribuírem para as propriedades gustativas finais da cerveja (KABELOVÁ et al., 2008). Os aminoácidos livres juntamente com outros constituintes não fermentados da cerveja podem proporcionar positivamente a palatabilidade da cerveja (NAGAO et al., 1999).

Os aldeídos são amplamente encontrados em produtos alimentares e podem se originar de matérias primas, da fermentação alcoólica ou a partir de uma grande variedade de reações químicas, tais como oxidação lipídica, reação de Maillard, degradação de Strecker e condensação aldólica (VANDERHAEGEN et al., 2006). Eles são comuns em bebidas alcoólicas, como a cerveja e, embora as suas concentrações sejam geralmente muito baixas, estes compostos são importantes, pois contribuem de forma indesejada no perfil de sabor (SAISON et al., 2009).

1.2. Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Os compostos fenólicos são genericamente designados por polifenóis, são sintetizados pelas plantas como resultado do metabolismo secundário e constituem estruturas químicas diversas, complexas e muito heterogêneas. Os polifenóis intervêm diretamente na pigmentação, crescimento, reprodução e proteção das plantas contra infecções e agentes agressores (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Nos alimentos, os compostos fenólicos conferem cor, aroma, adstringência e estabilidade oxidativa (MANACH et al., 2004). Na cerveja, os compostos fenólicos tem uma importância fisiológica, pois estão envolvidos na manutenção da espuma, estabilidade físico-química e na vida de prateleira. Os polifenóis são derivados de grãos de cereais e do lúpulo, e seu nível na cerveja está relacionado com variedades de malte e lúpulo e nos processos de obtenção da cerveja (DERDELINCKX, 2008; QINGMING et al., 2010).

A cana de açúcar também é uma fonte natural de compostos fenólicos (PAYET; SING; SMADJA, 2006) e diversos estudos demonstraram a presença de diversos polifenóis no caldo de cana (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; KADAM et al., 2008), no melaço (TAKARA et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2007) e no açúcar mascavo (PAYET, SING; SMADJA, 2006).

Os compostos fenólicos são agentes redutores e, em conjunto com outros componentes da dieta, podem proteger os tecidos corporais contra os danos causados pelos radicais livres nos lipídeos, proteínas e no DNA (BIRCH et al., 2001; YILDIRIM; MAVI; KARA, 2001).

Devido às suas características e propriedades antioxidantes, os polifenóis desempenham um papel importante na nutrição e na saúde humana (BRAVO, 1998).

Estudos com consumidores moderados de cerveja mostraram uma redução de 20-25% na taxa de mortalidade de doenças coronárias e uma redução de 50% do fator de risco de morte. Esse efeito benéfico da cerveja na saúde está relacionado principalmente aos compostos fenólicos, em especial pela sua atividade antioxidante e a sua biodisponibilidade (FUMI et al., 2011).

A capacidade antioxidante da cerveja é comparável à do vinho branco, mas inferior à do vinho tinto, além de possuir compostos antioxidantes diferentes, devido à composição do malte e do lúpulo diferir da composição das uvas (LUGASI, 2003).

Antioxidantes são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação. A

atividade antioxidante de compostos fenólicos é principalmente devida às suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e estabilização de radicais livres, quelando o oxigênio triplete e singlete ou decompondo peróxidos (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Existem moléculas, orgânicas e inorgânicas e átomos que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados livres. As moléculas e átomos que apresentam esta configuração são extremamente reativas, instáveis, possuem meia-vida curta e são normalmente chamados de radicais livres (HALLIWELL, 1994).

Radicais como o superóxido ($O_2^{\bullet}$) e hidroxil ($OH^{\bullet}$) podem danificar vários alvos celulares. Isso ocorre, pois estas espécies reativas de oxigênio (EROs) promovem uma oxidação prejudicial de diversos compostos orgânicos, como lipídeos, carboidratos e proteínas. A oxidação do DNA pode levar a mutações e carcinogênese; já a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) tem sido relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (RAHMAN; ADCOCK, 2006).

A formação de radicais livres é um processo natural nos seres humanos por meio da ação catalítica de enzimas nos processos celulares (ANTOLOVICH et al., 2002). Há uma série de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione transferase, catalase) atuando na remoção ou impedimento da formação destes radicais. No entanto, não existe apenas a defesa antioxidante das enzimas; mas também antioxidantes naturais e sintéticos podem ser fornecidos pela alimentação e por medicamentos, reagindo com os radicais livres e inibindo sua ação danosa no organismo. Os antioxidantes são definidos como quaisquer substâncias que, quando presentes em baixas concentrações, comparadas as de um agente oxidante, são capazes de prevenir a oxidação do substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

1.3. Análise sensorial

Embora os instrumentos analíticos sejam efetivos em detectar características físico-químicas importantes para a indústria de bebidas, não é possível mensurar a percepção humana. Desta forma, a análise sensorial mostra-se como uma ferramenta imprescindível para estudo de bebidas, uma vez que esta é a única forma de medir a intensidade de um aroma ou sabor, avaliar a aceitação ou ainda fornecer respostas para quantificar características sensoriais do produto (CARDELLO, 1999).

São muitas as aplicações da análise sensorial na indústria de alimentos e na pesquisa, como por exemplo, no controle das etapas de desenvolvimento de um novo produto, na avaliação do efeito das alterações nas matérias primas ou do processamento tecnológico sobre o produto final, na seleção de uma fonte de suprimento e até mesmo no controle da qualidade do produto, dentre outros. A avaliação e a caracterização sensorial fornecem suporte técnico para a pesquisa, industrialização, *marketing* e controle da qualidade dos alimentos e bebidas (DUTCOSKY, 1996; HARDWICK, 1994).

O consumidor é o destino final de todo e qualquer produto que seja desenvolvido, seja este um bem de consumo ou um alimento. Todo produto tem como objetivo final a aceitação e a satisfação de um consumidor (NGAPO et al., 2003).

É neste contexto que se percebe a força que o indivíduo exerce sobre o sucesso ou o fracasso de qualquer produto. É fundamental empreender esforços para avaliar a percepção dos fatores que determinam o comportamento do consumidor em relação a este produto. Somente o entendimento da relação entre o consumidor e produto é que pode garantir o sucesso do mesmo, a inovação e a manutenção de sua vantagem competitiva perante aos demais produtos do mercado (DELLA LUCIA; MINIM, 2006).

Uma vez que a satisfação do consumidor provém de sua percepção positiva acerca da qualidade do alimento, deve-se ter em mente que o próprio consumidor é quem deve ditar os parâmetros de qualidade desse produto (DELLA LUCIA, 2008).

2. MATERIAL E MÉTODOS

As cervejas foram elaboradas em escala de bancada (5 L), na Planta Piloto de Bebidas, do Departamento de Biotecnologia, da Escola de Engenharia de Lorena da USP, SP, onde também foi conduzida a análise sensorial. As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Enzima, Fermentação e Tecnologia Cervejeira (EFBT) na Universidade KU Leuven – Campus KAHO Sint- Lieven, Ghent, na Bélgica.

2.1. Material

A água utilizada no processo cervejeiro foi obtida do poço artesiano que abastece a Escola de Engenharia de Lorena. O malte de cevada claro do tipo Pilsen foi doado pela Malteria do Vale S/A, de Taubaté, SP e o lúpulo, do tipo Saaz, foi fornecido pela Vallerstein Industrial Ltda de São Paulo, SP.

O caldo de cana de açúcar (*Saccharum spp*) foi adquirido na cidade de Lorena, SP, e o melado foi obtido a partir da concentração do caldo.

Foi utilizada a linhagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, identificada pela Universidade Federal de Lavras, MG.

2.2. Métodos

2.2.1. Obtenção do caldo e do melado de cana

A cana de açúcar foi prensada em cilindros de uma moenda (Moedor de Cana Tradicional Elétrico Rolo Inox B-721T), separando-se o caldo e o bagaço, onde o caldo obtido foi colocado em garrafas de vidro esterilizadas e acondicionadas em isopor com gelo e trazidas imediatamente ao laboratório para a produção dos mostos.

Para a obtenção do melado, o caldo de cana foi submetido ao aquecimento em chapa aquecedora MA-038 (Marconi) atingindo uma fervura vigorosa até que a concentração de açúcares alcançasse 65°Brix, que foi medido em um refratômetro digital portátil (Atago).

2.2.2. Elaboração das cervejas

Foram elaboradas 5 tipos de cervejas: puro malte; com adição de 75% de malte e 25% de caldo de cana; 50% de malte e 50% de caldo de cana; 75% de malte e 25% de melado de cana e, 50% de malte e 50% de melado de cana.

2.2.3. Moagem do malte

O malte de cevada foi moído por 2 vezes consecutivas em moinho de rolos motorizado com distanciamento entre os rolos calibrado em 0,7 mm, para obtenção da granulometria adequada para a mosturação.

2.2.4. Mosturação

A mosturação foi realizada em panela de inox com adição de malte moído e água primária, onde a temperatura variou de 48 a 78°C e o pH inicial foi ajustado, quando necessário, em torno de 5,5 pela adição de ácido láctico (Synth), e adição de CaCl_2 (Synth) na proporção de 1,26 g/Kg de malte.

A adição de malte e água primária foi feita em uma proporção de 1 parte de malte para 3 partes de água.

O perfil de tempo e temperatura de ativação de cada enzima foi de 48, 52, 63, 70 e 78°C por 20, 20, 60, 30 e 10 minutos, respectivamente.

No final da mosturação, a 70°C, foi realizado o teste com solução de iodo 0,02N a fim de verificar a sacarificação do amido do malte. Após a confirmação da hidrólise desta macromolécula, pela ausência da cor roxo-azulada, característica da reação com a solução de iodo, em temperatura ambiente, o mosto foi aquecido até 78°C com o objetivo de inativar as enzimas presentes e finalizar o processo de mosturação.

Ao fim da mosturação, foi obtido o mosto primário.

2.2.5. Filtração/Clarificação do mosto

Após o término da hidrólise do amido, o mosto primário foi filtrado na própria panela onde ocorreu a mosturação por meio de uma rede de inox (0,6 mm) para a separação das cascas do malte, sendo que a camada filtrante formada pela própria casca do

malte serviu de filtro para a lavagem com água secundária a 80°C, originando o mosto secundário.

Esse volume de água secundária serviu para a extração dos açúcares residuais impregnados nas cascas do malte, portanto, o mosto secundário é oriundo da água de lavagem do bagaço de malte.

2.2.6. Fervura do mosto

O mosto misto, junção dos mostos primário e secundário, obtido após a filtração, foi submetido à fervura em uma panela de inox, por um período de 60 minutos, até atingir a concentração final de açúcares em 16°P de extrato original (primitivo).

Durante a fervura, foi adicionado lúpulo na forma de pellets, em proporções de 1,8 g/L no mosto acabado, sendo que no início da fervura foi acrescentado o lúpulo na concentração de 0,9 g/L em relação ao volume final e 0,9 g/L nos 15 minutos antes de completar o tempo de fervura total que foi de 1 hora.

2.2.7. Resfriamento do mosto

Após o término da fervura, o mosto foi circulado manualmente (espécie de redemoinho) com uso de uma espátula de inox e aguardado um tempo de aproximadamente 30 segundos para a formação de aglomerados protéicos ao fundo da panela, comumente conhecidos como *trub*, e o mesmo pudesse ser retirado. Esse processo de circulação do mosto faz com que as partículas decantem e se acomodem no centro da panela, evitando serem levadas para o fermentador.

Logo em seguida, o mosto foi passado para uma outra panela de inox limpa, onde foi resfriado com uso de *chiller* de inox limpo, que foi inserido dentro da panela contendo o mosto. Dentro das tubulações do *chiller* foi circulada água fria, retirando o calor do mosto, até atingir a temperatura de fermentação de 12°C.

2.2.8. Preparação do inóculo

Da cultura estoque da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, cultivada em tubos de ensaio contendo meio inclinado de ágar extrato de malte (Merck), e conservada a

4°C, por 48 horas, foi feita a transferência das células em condições assépticas para um tubo contendo 10 mL de mosto na concentração de 6°P. O cultivo foi realizado em estufa a 30°C por 24 horas.

Em seguida este volume de meio foi transferido para um erlenmeyer de 125 mL, contendo 90 mL de mosto na concentração de 12°P, totalizando 100 mL. O cultivo foi feito sob agitação, a 200 rpm e a temperatura de 30°C, até que concentração de açúcares abaixasse para 6°P (aproximadamente 24 horas).

O próximo passo foi transferir esse volume de 100 mL para 900 mL de mosto em um erlenmeyer de 2000 mL a 16°P, também sob agitação constante a 200 rpm e temperatura de 30°C, e o tempo de cultivo deste inóculo foi mantido por 24 horas.

Esse volume final de cultivo foi mantido em geladeira para a decantação das células e concentração das mesmas. Foi retirado o sobrenadante e efetuada a contagem de células.

Este inóculo foi então transferido para fermentadores contendo 5000 mL de mosto na concentração de 16°P de extrato original.

2.2.9. Fermentação

Para a condução das fermentações, o mosto foi adicionado em fermentadores elaborados com galões PET de 6000 mL, como mostra a Figura 19. As fermentações foram conduzidas à 12°C, em câmara fria e quando a concentração de açúcares atingiu a atenuação limite, a fermentação foi finalizada.

A fermentação foi iniciada com uma concentração celular de $1,6 \times 10^7$ células/mL em cada um dos fermentadores, contendo mosto na concentração de 16°P.

Figura 19 – Fermentadores adaptados com galões PET de 6000 mL.

Fonte: Arquivo pessoal.

2.2.10. Maturação

A maturação foi conduzida nos mesmos recipientes em que ocorreu a fermentação, por 2 semanas, em câmara fria, a 0°C.

2.2.11. Engarrafamento

A cerveja obtida após a maturação foi diluída com água mineral até atingir a concentração de 12°P, e a partir do volume final obtido foi adicionado solução de sacarose na concentração de 8 g/L para que ocorresse uma refermentação na garrafa e carbonatasse a cerveja. A cerveja foi adicionada em garrafas de 600 mL na cor âmbar, e esperado um tempo de 10 dias em temperatura ambiente, para que a refermentação fosse finalizada.

Esse processo de refermentação se dá, pois as leveduras que ficaram ainda na suspensão da cerveja utilizam a sacarose adicionada e forma-se o gás carbônico para a gaseificação da cerveja.

2.2.12. Análises físico-químicas

Os extratos original e aparente, grau aparente de fermentação e o conteúdo de álcool das cervejas foram medidos utilizando o equipamento analisador de cerveja (Beer Analyser 2, ANTON-PAAR®, Áustria).

O pH foi medido por potenciometria utilizando pHmetro MA-522 (Marconi). O teor de nitrogênio livre (análise de FAN) e a análise da cor das cervejas foram mensurados de acordo com os métodos 9.10 e 9.6, respectivamente, segundo a EUROPEAN BREWERY CONVENTION - EBC (2000).

2.2.13. Determinação de açúcares

Os açúcares foram determinados utilizando o equipamento HPLC- DP1-DP9. Antes das análises, as proteínas foram removidas das amostras de cerveja por precipitação com reagente Carrez. Assim, 20 µL de reagente de Carrez I (106 g de ferrocianeto de potássio triidratado ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) em 1000 mL de água), 20 µL de reagente de Carrez II (220 g de acetato de zinco diidratado ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) e 30 mL de ácido acético foram adicionados a 1 mL de cerveja previamente desgaseificada.

Após centrifugação a 11000 x g durante 5 minutos, as amostras de 20 µL foram injetadas em HPLC Waters 717. A quantificação dos açúcares foram obtidos utilizando uma coluna Nucleosil 100-5 NH_2 (250 x 4 mm de diâmetro interno; Macherey Nagel, Düren, Alemanha), que foi mantida a 30°C. Uma mistura de água/acetonitrila (33/67; v/v) foi utilizada como fase móvel utilizando uma bomba (Waters 616), com fluxo de 1 mL/min.

Os componentes foram detectados por um detector de índice de refração Waters 2414. A calibração foi realizada utilizando uma mistura de glicose e maltose, nas concentrações de 250 mg/L, 500 mg/L e 1000 mg/L de cada um dos componentes, respectivamente. Fatores de resposta relativos, em comparação com a maltose, foram determinados da maltotriose até a maltoheptaose e utilizados para a quantificação. A maltooctaose foi quantificada usando o mesmo fator de resposta da maltoheptaose.

2.2.14. Determinação de ésteres e álcoois superiores

As extrações de ésteres voláteis e álcoois superiores das cervejas foram determinados segundo Malfiet et al., 2008, com realização de micro extração em fase sólida (HS-SPME) durante 30 minutos a 40°C, utilizando uma fibra de 65 µm (PDMS-DVB). Os componentes foram separados e detectados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CGC/MS) (Dual Stage Quadrupolo (ITQ 1100), sistema GC/MS (Interscience Benelux). O ITQ 1100 foi acoplado a um ThermoFinnigan Trace GC (Interscience Benelux) equipado com um amostrador automático Combi-PAL, um injetor com um revestimento de vidro de entrada estreita (0,5 mL de volume), e uma coluna capilar de sílica fundida RTX-1 (40 m x 0,18 mm de diâmetro interno e 0,2 mm de espessura, Restek, Interscience Benelux).

O hélio foi o gás de arraste, a um fluxo de 0,8 mL/min. A temperatura do injetor foi de 230°C, em modo *split* 1:2. A temperatura da coluna foi mantida a 40°C durante 3 minutos, depois aumentada para 200°C a 6°C/min, seguida por um aumento até 250°C, a uma taxa de 15°C/min, e finalmente mantida a 250°C durante 3 minutos.

O processamento dos dados cromatográficos foi realizado utilizando o sistema de dados Xcalibur™ (Thermo Electron Corporation). Para cada componente, uma curva de calibração foi feita a fim de quantificar cada componente presente nas cervejas.

2.2.15. Determinação de aldeídos

Os aldeídos voláteis da cerveja foram determinados de acordo com Vesely et al. 2003, utilizando-se de micro extração em fase sólida (HS-SPME) com fibras de PFBOA (o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzilo)hidroxilamina) e os componentes foram separados e detectados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CGC/MS) (Dual Stage Quadrupole (DSQ™ II) GC/MS sistema (Interscience Benelux)).

O DSQ™ II foi acoplado ao GC Ultra (Interscience Benelux) equipado com um amostrador automático CTC-PAL, com um injetor revestido de vidro estreito (0,5 mL de volume), e uma coluna capilar de sílica RTX-1 (40 m x 0,18 mm de diâmetro interno, 0,2 µm de espessura, Restek, Interscience Benelux). O processamento de dados foi realizado por meio do sistema de dados XCalibur™ (Thermo Electron Corporation).

2.2.16. Determinação de diacetil

O diacetil foi extraído por micro extração em fase sólida (SPME) com uma fibra de PFBHA (o-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil) cloridrato de metil-hidroxilamina) e os componentes foram separados e detectados por cromatografia/espectrometria de massa (CGC/MS) (Dual Stage Quadrupole (DSQ™ II) GC/MS sistema (Interscience Benelux)). Estes parâmetros, juntamente com todos os outros que não são mencionados aqui, foram os mesmos conforme detalhado para as determinações de aldeídos. A corrida em cromatografia gasosa levou 28 minutos no total. Para o programa do forno, o tempo inicial de 2 minutos realizou-se a 50°C, seguido por um aumento de 6°C/min, até 250°C (mantida durante 5 minutos). O diacetil tem um tempo de retenção de aproximadamente 18,8 min. A injeção ocorreu a 250°C. A temperatura da fonte foi de 175°C e o benzaldeído foi utilizado como um padrão interno.

2.2.17. Determinação do perfil de aminoácidos

A determinação dos aminoácidos foi feita segundo De Rouck (2013). O sistema de separação Acquity Ultra Performance LC (UPLC) foi utilizado para quantificar os aminoácidos livres nas cervejas. Antes da derivatização dos aminoácidos, as proteínas foram removidas. Assim, 20 µL de reagente de Carrez I (106 g de ferrocianeto de potássio trihidratado ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) em 1000 mL de água), 20 µL de reagente de Carrez II (220 g de acetato de zinco dihidratado ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) e 30 µL de ácido acético foram adicionados a 1 mL de cerveja. Depois disso, a amostra foi centrifugada num microtubo de Eppendorf de 2 mL durante 5 minutos. A derivatização das amostras foi feita utilizando o pacote Waters AccQ-Tag Ultra Química. A reação da derivatização requer a diluição com um tampão de borato, reação com ACQ, seguido de inativação do excesso de agente de derivatização. O pacote de derivatização de aminoácido Ultra AccQ-Tag, fornecido pela Waters continha todos os reagentes necessários.

A separação dos aminoácidos foi realizada utilizando o equipamento UPLC Acquity (Waters, Milford, EUA), que consiste de um detector PDA, forno, bomba de solvente binário, e uma coluna ultra-AccQ Tag™ (2,1 mm de diâmetro interno x 100 mm; Waters, EUA). O processamento dos dados foi feito pelo software Epower 2.

As condições cromatográficas foram as seguintes: AccQ-Tag Ultra Eluent A concentrado (diluído 10 vezes) (Waters, Milford, EUA); AccQ-Tag Ultra Eluent B (Waters,

Milford, EUA). Eluição: gradiente de eluição de acordo com Waters AccQ-Tag Ultra method. Tempo de análise: 9,5 minutos. Fluxo: 0,7 mL/min. Temperatura da coluna: 60°C.

2.2.18. Compostos fenólicos

A quantidade de compostos fenólicos totais foi determinada pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Folin-Ciocalteu, segundo Singleton e Rossi (1965), com algumas modificações.

Um volume de 0,2 mL da amostra de cerveja (diluída adequadamente), 0,8 mL de solução de carbonato sódico 7,5% (Synth) e 1,0 mL do reagente Folin-Ciocalteu 0,2 N (Imbralab) foram misturados. A absorbância foi medida em 765 nm após 2 horas de repouso em temperatura ambiente, em espectrofotômetro UV-visível Ultrospec 3100 pro (Amersham Biosciences).

A faixa da curva de calibração foi de 10 a 100 mg/L de ácido gálico e os resultados foram expressos em mg GAE/L (equivalente ácido gálico/L).

2.2.19. Atividade antioxidante

2.2.19.1. Reação com radical DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazilo)

Desenvolvido por Brand-Williams et al., (1995) o método DPPH tem como base a redução da absorbância na região visível de comprimento de onda de 517 nm do radical DPPH por antioxidantes.

A solução do radical de DPPH 100 M (3,9 mL) dissolvido em metanol (Vetec) a 80%, foi preparada de forma a apresentar absorbância em 517 nm entre 0,6 e 0,7. Foi adicionado 0,1 mL da amostra ou padrão, com homogeneização cuidadosa e manteve-se em local escuro, à temperatura ambiente, por 30 minutos. A medida de absorbância da solução de DPPH foi feita a 517 nm, em espectrofotômetro UV-visível Ultrospec 3100 pro (Amersham Biosciences), antes de adicionar a amostra (A0) e depois de adicionar amostra a 30 minutos de reação (Af). A concentração de DPPH no meio de reação foi calculada conforme a curva de calibração obtida por regressão linear. A faixa da curva de calibração foi de 1 a 40 µg/L de DPPH e os resultados foram expressos em TEAC, Trolox (µmol TEAC/L de amostra).

2.2.19.2. Reação com radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico)

A reação com o radical ABTS foi realizado de acordo como método descrito por Re et al. (1999) e modificado por Kuskoski et al. (2004). O radical $ABTS^{•+}$ é formado por uma reação química com persulfato de potássio em uma relação estequiométrica de 1: 0,5. Uma vez formado, o radical $ABTS^{•+}$ foi diluído em etanol até obter-se uma medida de absorbância de 0,70 ($\pm 0,02$) a 754 nm e a uma temperatura de equilíbrio de 30°C. Alíquota de 980 μ L do radical diluído foi transferida para cubeta e 20 μ L da amostra de cerveja diluída adequadamente foi adicionada. A absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-visível Ultrospec 3100 pro (Amersham Biosciences), no tempo de 7 minutos após a adição da amostra.

Foi preparada uma curva de calibração com soluções de Trolox (antioxidante sintético similar a vitamina E) e vitamina C (ácido ascórbico) na faixa de 20 a 100 μ M. Os resultados foram expressos em TEAC, atividade antioxidante equivalente ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) em μ mol TEAC/L de amostra.

2.2.20. Análise sensorial

Para a análise sensorial foram elaborados 5 litros de cada tipo de cerveja: puro malte; 75% malte e 25% caldo de cana; 50% malte e 50% caldo de cana; 75% malte e 25% melado de cana e 50% malte e 50% melado de cana.

Foi empregado o teste de aceitação usando a escala hedônica de 9 pontos, para a escolha da melhor proporção de caldo ou melado de cana, com a nota 9 significando gostei muitíssimo, a nota 5 significando não gostei nem desgostei, a nota 1, desgostei muitíssimo. A aplicação do teste sensorial foi realizada conforme metodologia descrita por Meilgaard (2001).

As amostras foram apresentadas em blocos completos aos 120 consumidores habituais de cerveja, previamente recrutados, em duas sessões em dias diferentes.

Amostras de cerveja de 40 mL foram servidas em copos de acrílico codificados com três dígitos à temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$, acompanhadas de água, biscoito “cream cracker” e a ficha de avaliação sensorial (APÊNDICE C).

Os testes sensoriais foram realizados em cabinas individuais com a utilização de luz branca no laboratório de Análise Sensorial da Microcervejaria da EEL. Os indivíduos que

participaram do teste foram recrutados por intermédio de informativos distribuídos nos *campi* da Escola de Engenharia de Lorena, de forma voluntária, maiores de 18 anos.

Os consumidores avaliaram os atributos: aparência, cor, odor, sabor e impressão global.

Simultaneamente, também foi avaliada a atitude de compra em relação ao produto usando escala estruturada de 5 pontos, com a nota 5 significando certamente compraria e a nota 1, certamente não compraria.

A partir de um questionário de recrutamento, os consumidores foram selecionados para participar do teste (APÊNDICE A). A etapa de análise sensorial foi aprovada pelo comitê de ética para a sua execução (Número CAAE: 09231013.9.0000.5501) e os consumidores assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para participarem das análises (APÊNDICE B).

2.3. Análise dos resultados

Todas as análises físico-químicas foram realizadas em triplicata, e os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP). Foram realizadas análises de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para identificar diferenças significativas entre as médias, usando o programa *SigmaStat 3.5*. Diferenças entre as médias no nível de 5% ($p \leq 0,05$) foram consideradas significativas.

Para a Análise Sensorial, a análise da distribuição dos escores hedônicos (escores observados versus os escores esperados para uma binomial) pelo teste qui-quadrado foi utilizada para cada amostra e para cada atributo, juntamente com o teste Kolmogorov-Smirnov antes da análise de variância (ANOVA) para cada conjunto de dados. Para os casos em que o teste Kolmogorov-Smirnov foi significativo, utilizou-se a análise de agrupamentos para segmentação, aplicando-se a análise de variância (ANOVA) posterior para os grupos homogêneos. O teste de Tukey foi adotado para identificar diferenças significativas entre as médias, usando o programa *XLSTAT*. Diferenças entre as médias no nível de 5% ($p \leq 0,05$) foram consideradas significativas.

Para análise de agrupamentos utilizou-se uma combinação dos métodos: hierárquico e não hierárquico, recomendada por Hair e colaboradores (2005). Primeiro, uma técnica hierárquica pode estabelecer o número de agrupamentos, caracterizar os centros de agrupamentos e identificar quaisquer observações atípicas óbvias. Depois que os

casos atípicos foram eliminados, as demais observações podem então ser agrupadas por um método não hierárquico com os centros de grupos dos resultados hierárquicos como os pontos sementes iniciais. Desse modo, as vantagens dos métodos hierárquicos são complementadas pela habilidade dos métodos não hierárquicos para “refinar” os resultados, pela possibilidade de alteração de pertinência a grupos.

Paralelamente, para auxiliar a interpretação dos resultados, utilizou-se o histograma dos escores hedônicos e a classificação das regiões de aceitação (proporção de escores ≥ 7) e de rejeição (proporção de escores ≤ 4) e a região da indiferença ou considerada neutra (proporção de escores 5 e 6).

Para o atributo impressão global foi desenvolvido mapa de preferência com base na análise fatorial de componentes principais – ACP – para posicionamento da relação entre os produtos e entendimento da expressão de preferência do consumidor para o grupo das cervejas em análise.

3. RESULTADOS

3.1. Análises físico-químicas

Os resultados das análises dos cinco tipos de cervejas estão apresentados na Tabela 14. As cervejas continham teores de etanol entre 6,06 e 6,89% (v/v), ao passo que os extratos aparentes variaram entre 0,10 e 1,45 g/100g. Os valores de pH ficaram entre 4,00 e 4,61, com valores mais baixos para as cervejas contendo 50% de caldo e 50% de melado de cana, respectivamente. Nos ensaios de cerveja com adição de 50% de cana ou 50% de melado, o grau aparente de fermentação foi mais elevado devido à presença de quantidades elevadas de açúcares fermentescíveis. A cerveja produzida com 100% de mosto de malte não foi capaz de alcançar as mesmas atenuações finais e níveis de álcool como as cervejas produzidas com caldo ou melado de cana.

Grandes diferenças no conteúdo de FAN foram observadas entre as cervejas. Em particular, a cerveja puro malte teve níveis mais elevados de FAN do que as demais cervejas, seguido pelas cervejas com 25% de caldo e 25% melado. As cervejas com proporção de 50% apresentaram os menores teores de FAN.

Nesse estudo, a cerveja com 100% de malte foi a que apresentou a coloração mais escura em relação às demais. Quando se comparou as cervejas com 25% de adjunto, a com melado foi a mais escura e o mesmo aconteceu para as cervejas com adição de 50% de adjunto.

A concentração de diacetil foi maior na cerveja com 50% de melado. O diacetil é produzido durante a fermentação primária e a sua concentração é geralmente usada como um indicador da conclusão da fermentação ou maturação (PETERSEN et al., 2004).

O diacetil tem valores muito baixos de limiar sensorial. Seu odor, que se assemelha ao aroma de manteiga, pode ser reconhecido, em concentrações tão baixas quanto 0,1 mg/L. O diacetil também é um composto de aroma importante de cerveja fresca e sua redução só é possível com a ajuda de células de levedura, as quais reduzem o diacetil em acetoina e depois em butanodiol. O butanodiol possui um limiar sensorial muito alto e não é reconhecível em cerveja (KLOSE et al., 2011).

A concentração limiar para o diacetil em cervejas *lager* é de 0,1-0,4 mg/L, sendo que para níveis superiores a 1 mg/L a cerveja passa a ter gosto de “queijo”

(ŠMOGROVIČOVÁ; DÖMÉNY, 1999). Neste estudo, todas as cervejas apresentaram concentrações de diacetil abaixo do seu limiar.

Tabela 14 – Análises físico-químicas de cervejas puro malte e com adição de caldo ou melado de cana, em diferentes concentrações.

	unidade	PM	25C	25M	50C	50M
Etanol	v/v %	6,06 ^c ± 0,00	6,50 ^b ± 0,05	6,22 ^c ± 0,03	6,79 ^a ± 0,05	6,89 ^a ± 0,12
Extrato aparente	g/100g	1,45 ^a ± 0,03	0,22 ^c ± 0,01	1,28 ^b ± 0,02	0,10 ^c ± 0,02	0,17 ^c ± 0,01
Extrato original	g/100g	12,81 ^a ± 0,22	12,46 ^a ± 0,11	12,44 ^a ± 0,05	12,76 ^a ± 0,18	12,35 ^a ± 0,05
GAF	%	88,65 ^b ± 0,80	98,27 ^a ± 0,23	88,81 ^b ± 0,16	98,99 ^a ± 0,04	98,48 ^a ± 0,11
pH	-	4,61 ^a ± 0,02	4,40 ^b ± 0,05	4,55 ^{ab} ± 0,02	4,00 ^d ± 0,08	4,20 ^c ± 0,03
FAN	(mg/L)	53,96 ^a ± 0,002	47,94 ^b ± 0,001	35,43 ^c ± 0,009	27,55 ^d ± 0,001	24,09 ^e ± 0,001
Cor	EBC	13,38 ^a ± 0,01	11,04 ^c ± 0,01	12,35 ^b ± 0,01	7,91 ^e ± 0,00	13,21 ^d ± 0,01
Diacetil	µg/L	13,4 ^b ± 0,2	17,3 ^{ab} ± 4,0	9,2 ^b ± 0,1	17,8 ^{ab} ± 0,0	26,1 ^a ± 4,3

PM: puro malte, 25C: cerveja elaborada com 25% de caldo de cana; 50C: cerveja elaborada com 50% de caldo de cana; 25M: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; 50M: cerveja elaborada com 50% de melado de cana. Médias seguidas de mesma letra na mesma linha significa que não há diferença entre si a $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey.

3.1.1. Determinação de açúcares

O conteúdo de açúcares nas cervejas analisadas encontra-se na Tabela 15. Os teores de açúcares tais como maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e a maltohexaose diminuíram com a adição de adjunto, sendo maiores na cerveja puro malte.

A glicose foi totalmente consumida durante a fermentação e a maltoheptaose e a maltooctaose não foram detectadas nas cervejas finais.

Tabela 15 – Concentrações de açúcares em cervejas puro malte e com adição de caldo ou melado de cana.

Açúcares	unidade	PM	25C	25M	50C	50M
Glicose	g/L	0,027 ± 0,00	0,000	0,000	0,000	0,000
Maltose	g/L	0,801 ^a ± 0,03	0,773 ^b ± 0,00	0,705 ^c ± 0,14	0,660 ^d ± 0,04	0,536 ^e ± 0,04
Maltotriose	g/L	1,762 ^a ± 0,03	1,566 ^b ± 0,04	1,408 ^{bc} ± 0,02	1,317 ^c ± 0,07	1,373 ^c ± 0,02
Maltotetraose	g/L	1,121 ^a ± 0,04	0,569 ^b ± 0,07	0,473 ^b ± 0,07	0,456 ^b ± 0,08	0,711 ^b ± 0,08
Maltopentaose	g/L	0,359 ^a ± 0,01	0,224 ^b ± 0,01	0,203 ^b ± 0,03	0,196 ^b ± 0,04	0,289 ^{ab} ± 0,04
Maltohexaose	g/L	0,584 ^a ± 0,01	0,482 ^{ab} ± 0,05	0,422 ^{ab} ± 0,03	0,395 ^b ± 0,06	0,363 ^b ± 0,06
Maltoheptaose	g/L	nd*	nd	nd	nd	nd
Maltooctaose	g/L	nd	nd	nd	nd	nd

PM: puro malte, 25C: cerveja elaborada com 25% de caldo de cana; 50C: cerveja elaborada com 50% de caldo de cana; 25M: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; 50M: cerveja elaborada com 50% de melado de cana. Letras diferentes na mesma linha implicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras pelo Teste de Tukey. *nd: não detectado.

3.1.2. Determinação de ésteres e álcoois superiores

Perfis quantitativos de ésteres e de álcoois superiores foram realizados para as 5 diferentes cervejas (Tabela 16).

Em relação aos álcoois superiores (iso-butanol, 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol), houve um aumento em sua produção quando se adicionou caldo ou melado de cana, em comparação com a cerveja puro malte, exceto para o composto n-propanol. O composto 3-metil-1-butanol foi o que esteve em maior quantidade nas cervejas em questão.

De acordo com Meilgaard (1975), álcoois superiores proporcionam sabores alcoólicos, assim como sabor doce à cerveja e são comumente encontrados em cervejas do tipo *lager*.

Para os ésteres acetato de isobutila, butanoato de etila, acetato de isoamila, octanoato de etila e feniletilacetato, houve um aumento com a adição de caldo ou melado de cana. O oposto aconteceu para os ésteres hexanoato de etila e decanoato de etila.

No caso do éster acetato de etila houve um aumento na sua produção com a adição de 25% de caldo ou melado quando comparados com a cerveja puro malte, e uma diminuição para as cervejas com 50% de caldo ou melado. O acetato de etila foi o éster presente em maior quantidade em todas as cervejas avaliadas.

O acetato de etila é o éster que possui maior influência no aroma e sabor da cerveja, de modo que se sua concentração for muito alta, ela pode distorcer o seu aroma, característica forte de cerveja do tipo *ale* (ARAÚJO; SILVA; MINIM, 2003).

Os ésteres voláteis introduzem notas de sabor frutado e são considerados atributos altamente positivos para o sabor fresco da cerveja (VANDERHAEGEN et al., 2006).

Tabela 16 – Concentrações de ésteres e álcoois superiores em cervejas puro malte e com adição de caldo ou melado de cana.

		PM	25C	25M	50C	50M
n-propanol	mg/L	18,0 ^a ± 7,4	16,1 ^a ± 0,3	15,4 ^a ± 1,0	14,0 ^a ± 6,9	13,1 ^a ± 0,9
Acetato de etila	mg/L	36,5 ^{ab} ± 0,2	45,3 ^a ± 4,7	39,8 ^{ab} ± 1,7	36,1 ^{ab} ± 3,4	31,0 ^b ± 0,3
Iso-butanol	mg/L	22,9 ^b ± 2,0	27,4 ^{ab} ± 2,6	31,1 ^{ab} ± 2,4	36,1 ^a ± 5,3	25,9 ^{ab} ± 1,6
3-metil-1-butanol	mg/L	50,2 ^a ± 1,7	54,2 ^a ± 5,6	56,6 ^a ± 2,0	59,3 ^a ± 4,7	54,6 ^a ± 0,8
2-metil-1-butanol	mg/L	20,0 ^b ± 0,6	25,6 ^b ± 3,0	25,1 ^b ± 1,0	37,6 ^a ± 4,1	24,9 ^b ± 0,2
Acetato de isobutila	µg/L	1296,0 ^e ± 0,1	2018,8 ^c ± 0,1	3031,6 ^a ± 0,2	1786,2 ^d ± 0,0	2368,0 ^b ± 0,0
Butanoato de etila	µg/L	78,0 ^c ± 0,0	96,9 ^d ± 0,0	106,7 ^b ± 0,0	110,0 ^a ± 0,0	100,4 ^c ± 0,0
Acetato de isoamila	µg/L	1161,4 ^e ± 0,1	1791,2 ^c ± 0,0	2461,4 ^a ± 0,2	1207,5 ^d ± 0,0	1940,4 ^b ± 0,1
Hexanoato de etila	µg/L	2,8 ^a ± 0,0	0,6 ^c ± 0,0	0,7 ^b ± 0,0	0,6 ^c ± 0,0	0,4 ^c ± 0,0
Octanoato de etila	µg/L	251,6 ^c ± 0,0	311,0 ^c ± 0,1	288,8 ^d ± 0,0	390,0 ^a ± 0,0	346,2 ^b ± 0,0
Feniletilacetato	µg/L	526,5 ^c ± 0,0	825,2 ^c ± 0,1	889,9 ^a ± 0,1	736,0 ^d ± 0,0	888,0 ^b ± 0,0
Decanoato de etila	µg/L	42,0 ^b ± 0,0	42,6 ^a ± 0,0	41,8 ^c ± 0,0	37,8 ^d ± 0,0	36,9 ^e ± 0,0

PM: puro malte, 25C: cerveja elaborada com 25% de caldo de cana; 50C: cerveja elaborada com 50% de caldo de cana; 25M: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; 50M: cerveja elaborada com 50% de melado de cana. Letras diferentes na mesma linha implicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras pelo Teste de Tukey.

3.1.3. Determinação de aldeídos

Perfis quantitativos de aldeídos também foram obtidos para as 5 cervejas elaboradas e os valores encontram-se na Tabela 17.

Os aldeídos investigados podem ser originados a partir da degradação de Strecker (2-metil-propanal, 2 e 3-metilbutanal, metional, benzaldeído, fenilacetaldeído), aldeídos formados durante as reações de Maillard (furfural), e aldeídos formados pela oxidação de lípidos (hexanal, trans-2-nonenal).

Tabela 17 – Concentrações de aldeídos em cervejas puro malte e com adição de caldo ou melado de cana.

Aldeídos	Unidade	PM	25C	25M	50C	50M
2-Metil-propanal	μg/L	10,4 ^a ± 0,4	7,2 ^b ± 0,2	2,5 ^d ± 0,0	5,1 ^c ± 0,0	7,8 ^b ± 0,1
2-Metil-butanal	μg/L	2,3 ^d ± 0,1	2,8 ^c ± 0,0	0,8 ^c ± 0,0	4,4 ^b ± 0,1	7,5 ^a ± 0,2
3-Metil-butanal	μg/L	6,6 ^b ± 0,5	6,5 ^b ± 1,6	1,3 ^c ± 0,1	9,2 ^b ± 0,1	22,4 ^a ± 0,4
Hexanal	μg/L	0,2 ^b ± 0,0	0,2 ^b ± 0,0	0,1 ^c ± 0,0	0,3 ^a ± 0,0	0,3 ^a ± 0,0
Furfural	μg/L	11,8 ^b ± 3,2	11,7 ^b ± 1,8	3,4 ^c ± 0,4	23,0 ^a ± 0,5	25,8 ^a ± 1,4
Metional	μg/L	4,1 ^b ± 0,1	4,3 ^b ± 0,5	1,6 ^c ± 0,3	3,3 ^b ± 0,4	8,3 ^a ± 0,1
Benzaldeído	μg/L	0,7 ^b ± 0,1	0,8 ^{ab} ± 0,1	0,3 ^c ± 0,0	1,1 ^a ± 0,0	1,1 ^a ± 0,1
Fenilacetaldéido	μg/L	21,6 ^b ± 1,9	22,3 ^b ± 1,1	9,5 ^c ± 0,4	25,4 ^b ± 0,2	70,5 ^a ± 16,7
t-2-Nonenal	μg/L	0,03 ^b ± 0,0	0,03 ^b ± 0,0	0,03 ^b ± 0,01	0,03 ^b ± 0,0	0,05 ^a ± 0,0

PM: puro malte, 25C: cerveja elaborada com 25% de caldo de cana; 50C: cerveja elaborada com 50% de caldo de cana; 25M: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; 50M: cerveja elaborada com 50% de melado de cana. Letras diferentes na mesma linha implicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras pelo Teste de Tukey.

Na cerveja com adição de 25% de melado, todos os aldeídos avaliados estiveram em menores concentrações comparados com as demais cervejas produzidas no presente trabalho.

Para os aldeídos 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, furfural, metional e fenilacetaldéido as concentrações foram maiores para a cerveja com adição de 50% de melado de cana. Já para os aldeídos hexanal, benzaldeído e t-2-nonenal as diferenças foram muito pequenas entre as cervejas analisadas, mas sempre foram maiores para a cerveja com 50% de melado.

A cerveja puro malte apresentou o teor mais elevado apenas de 2-metil-propanal comparada com as cervejas elaboradas com adição de adjunto.

3.1.4. Determinação de aminoácidos

Perfis detalhados de aminoácidos são apresentados para as cervejas puro malte (Figura 20), para cervejas contendo adição de caldo de cana (Figura 21) e para as cervejas contendo adição de melado de cana (Figura 22).

A cerveja puro malte mostrou claramente uma composição maior de aminoácidos. Nas cervejas com adição de caldo ou melado, verifica-se que na grande maioria dos aminoácidos, há uma maior quantidade em proporções de 25%, ou seja, quando se aumenta a adição de adjunto, há uma queda na quantidade dos teores de aminoácidos.

Figura 20 – Perfil de aminoácido em cerveja 100% malte.

His: histidina; Asn: asparagina; Ser: serina; Gln: glutamina; Arg: arginina; Gly: glicina; Asp: ácido aspártico; Glu: ácido glutâmico; Thr: treonina; Ala: alanina; Pro: prolina; Cys: cistina + cisteína; Lys: lisina; Tyr: tirosina; Met: metionina; Val: valina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Phe: fenilalanina; Trp: triptofano.

PM: puro malte.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 21 – Perfil de aminoácidos em cervejas contendo 25% e 50% de caldo de cana.

His: histidina; Asn: asparagina; Ser: serina; Gln: glutamina; Arg: arginina; Gly: glicina; Asp: ácido aspártico; Glu: ácido glutâmico; Thr: treonina; Ala: alanina; Pro: prolina; Cys: cistina + cisteína; Lys: lisina; Tyr: tirosina; Met: metionina; Val: valina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Phe: fenilalanina; Trp: triptofano.

25C: cerveja elaborada com 25% de caldo de cana; 50C: cerveja elaborada com 50% de caldo de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 22 – Perfil de aminoácidos em cervejas contendo 25% e 50% de melado de cana.

His: histidina; Asn: asparagina; Ser: serina; Gln: glutamina; Arg: arginina; Gly: glicina; Asp: ácido aspártico; Glu: ácido glutâmico; Thr: treonina; Ala: alanina; Pro: prolina; Cys: cistina + cisteína; Lys: lisina; Tyr: tirosina; Met: metionina; Val: valina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Phe: fenilalanina; Trp: triptofano.

25M: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; 50M: cerveja elaborada com 50% de melado de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto maior a proporção de adjunto no mosto cervejeiro, mais escassa será a concentração de aminoácidos (valina e isoleucina, por exemplo) para a levedura, ocasionando diversos problemas para a etapa de fermentação. Com a carência de aminoácidos no meio, a levedura irá sintetizar a valina e a isoleucina, o que acarretará uma redução da propagação do fermento e uma formação excessiva de dicetonas vicinais. Durante a síntese pela levedura desses aminoácidos, dá-se a formação do diacetil e do 2,3 pentanodiona (BOULTON et al., 2001).

Como esperado, a prolina é o aminoácido em maior concentração em todas as cervejas avaliadas. Segundo Perpète et al. (2005), concentrações de prolina aumentam durante a germinação de cevada, atingindo um nível máximo após 8 dias. Além disso, a prolina é utilizada pela levedura em pequenas quantidades em mostos em condições anaeróbicas e é lentamente absorvida sob condições aeróbicas. Esta é a razão de encontrar maiores concentrações de prolina nas amostras de cerveja.

Os aminoácidos podem influenciar o sabor da cerveja, uma vez que a levedura metaboliza esses componentes por meio de vários processos bioquímicos. Sabe-se que de todos os processos bioquímicos que ocorrem na produção de cerveja, a proteólise é primariamente responsável, uma vez que produz os aminoácidos livres e peptídeos que contribuem para o *flavor* de cerveja e também são precursores, comportando-se como substratos para várias reações enzimáticas. Deve notar-se que os aminoácidos também influenciam a cor do produto final, uma vez que, durante a ebulição, os aminoácidos, em especial a prolina, reage com a maltose (reação de Maillard), proporcionando o maltol e produtos coloridos conhecidos como melanoidinas. Finalmente, os aminoácidos afetam a estabilidade biológica das cervejas finais (POMILIO et al., 2010).

3.2. Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Nas diferentes cervejas elaboradas, os compostos fenólicos determinados neste estudo estão apresentados na Tabela 18, variando de $404,59 \pm 0,002$ a $456,20 \pm 0,001$ mg/L.

Observa-se que a cerveja com adição de 50% de caldo de cana é que apresentou o maior valor de polifenóis totais, com diferença significativa entre os outros tipos de cerveja. Em seguida, as cervejas com maior conteúdo de polifenóis são com 25% de caldo de cana, 50% de melado de cana, 25% de melado e a que apresenta o menor teor de polifenóis foi a cerveja puro malte, ou seja, a elaborada apenas com malte de cevada.

Essa variação nos teores de compostos fenólicos entre as amostras parece estar relacionada com a adição de caldo de cana, ou seja, as cervejas com adição de caldo de cana tem maiores teores, seguida das adicionadas de melado e ao final, a cerveja sem adição de adjunto.

Tabela 18 – Compostos fenólicos totais (TPC) e atividade antioxidante pelos radicais DPPH e ABTS.

Tipo	TPC* (mg GAE/L^a)	DPPH (μMol/L TEAC^b)	ABTS (μMol/L TEAC^c)
PM	404,59 ^c ± 0,002	1199,61 ± 0,02	2716,11 ± 0,02
25C	430,39 ^b ± 0,003	1294,33 ± 0,02	2834,52 ± 0,02
25M	424,19 ^d ± 0,004	1230,15 ± 0,01	2760,39 ± 0,01
50C	456,20 ^a ± 0,001	2086,17 ± 0,02	3023,08 ± 0,02
50M	427,53 ^c ± 0,004	1295,60 ± 0,01	2840,99 ± 0,01

*TPC: Compostos fenólicos totais; ^aGAE/L: equivalente ácido gálico/L; ^bTEAC: atividade antioxidante equivalente ao trolox obtida em 30 min; ^cTEAC: atividade antioxidante equivalente ao trolox em 7 minutos. Letras diferentes na mesma coluna implicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras pelo Teste de Tukey. PM: puro malte, 25C: cerveja elaborada com 25% de caldo de cana; 25M: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; 50C: cerveja elaborada com 50% de caldo de cana; 50M: cerveja elaborada com 50% de melado de cana.

Em estudos com cervejas, SAURA et al. (2003), determinaram os compostos fenólicos e encontraram valores para cervejas de cevada clara de 336 ± 8 mg/L. Já FREITAS et al. (2006), obtiveram valores na média de $405,5 \pm 5,81$ mg/L também para cervejas de cevada clara.

A fim de uma maior comparação, foi realizado no presente trabalho, a análise de compostos fenólicos e também da atividade antioxidante em 5 marcas de cervejas de cevada clara comerciais (Tabela 19). Os valores de compostos fenólicos variaram de $436,42 \pm 459,35 \pm 0,002$ mg/L, ou seja, valores um pouco superiores aos das cervejas elaboradas neste estudo.

Tabela 19 – Compostos fenólicos totais (TPC) e atividade antioxidante pelos radicais DPPH e ABTS de cervejas comerciais.

Tipo	TPC* (mg GAE/L^a)	DPPH (μMol/L TEAC^b)	ABTS (μMol/L TEAC^c)
marca A	459,35 ^a ± 0,002	1994,42 ± 0,02	1748,45 ± 0,02
marca B	459,35 ^a ± 0,002	2076,58 ± 0,01	1716,11 ± 0,01
marca C	457,92 ^b ± 0,002	1825,71 ± 0,01	1673,83 ± 0,01
marca D	446,45 ^c ± 0,001	1736,77 ± 0,01	1343,48 ± 0,01
marca E	436,42 ^d ± 0,001	1600,67 ± 0,01	1170,34 ± 0,01

*TPC: Compostos fenólicos totais; ^aGAE/L: equivalente ácido gálico/L; ^bTEAC: atividade antioxidante equivalente ao trolox obtida em 30 min; ^cTEAC: atividade antioxidante equivalente ao trolox em 7 minutos. Letras diferentes na mesma coluna implicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras pelo Teste de Tukey.

Os resultados obtidos de atividade antioxidante, determinados pelos radicais DPPH e ABTS também encontram-se na Tabela 18 para as cervejas elaboradas e na Tabela 19 para as cervejas comerciais.

No método DPPH, para as amostras elaboradas com adição de caldo ou melado de cana, foi obtida uma média de 1421,17 μMol TEAC/L e para as cervejas comerciais uma média de 1846,83 μMol TEAC/L, com medidas no tempo de 30 minutos.

Os resultados da atividade antioxidante aplicando o método ABTS, medidas no tempo de 7 minutos, foram em média 2835,02 μMol TEAC/L para as cervejas elaboradas e 1530,44 μMol TEAC/L para as cervejas comerciais.

Pellegrini et al. (2003) ao avaliar a capacidade antioxidante de diversas bebidas, encontraram valores de 1040 μMol TEAC/L em cervejas de cevada claras, aplicando o método ABTS. Esse valor foi inferior ao determinado no presente estudo.

Gasowski et al. (2004) avaliaram a atividade antioxidante de cervejas também pelo método ABTS e encontraram resultados na faixa de 1650 a 2070 μMol TEAC/L. Freitas et al. (2006) avaliaram a atividade antioxidante pelo método ABTS uma média de 2347,89 μMol TEAC/L para cervejas de cevada claras e de 1370,14 μMol TEAC/L para o método DPPH.

A correlação entre compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das cervejas elaboradas no presente trabalho pelo método ABTS e pelo método DPPH apresentou resposta linear. Pelo método ABTS o coeficiente de correlação ($R = 0,9327$) foi maior que o obtido com o método DPPH ($R = 0,7825$).

Para as cervejas comerciais, a correlação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante também apresentou resposta linear e o coeficiente de correlação foi maior para o método ABTS ($R = 0,9837$) do que para o método DPPH ($R = 0,8179$).

Outros estudos com cervejas também encontraram uma correlação positiva entre o índice de compostos fenólicos e a atividade antioxidante, tais como Alonso et al. (2002) e Freitas et al. (2006).

3.3. Análise sensorial

Os cento e vinte consumidores recrutados para o teste de aceitação foram aqueles que declararam consumir a bebida pelo menos uma vez por mês. Dentre os consumidores selecionados, 68% eram do sexo masculino e 32% do sexo feminino, sendo a grande maioria constituída por pessoas com o ensino médio completo (68%), e idade entre 18 e 29 anos (77%) (Figura 23).

Figura 23 – Caracterização dos consumidores em relação ao sexo, à escolaridade, à faixa etária e a frequência de consumo da bebida.

Fonte: Arquivo pessoal.

3.3.1. Análise da aceitação dos atributos cor e aparência

A Tabela 20 mostra as médias dos escores hedônicos para o atributo COR da cerveja para os três grupos (segmentados quanto às suas preferências e rejeições) e a diferença estatística entre elas nos diferentes produtos testados. Também é possível visualizar as médias na Figura 24.

Tabela 20 – Escores hedônicos médios para os três grupos de aceitação quanto ao atributo cor da cerveja.

Cervejas	Grupo 1 (49%)		Grupo 2 (13%)		Grupo 3 (38%)	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
	Aceitação	Padrão	Aceitação	Padrão	Aceitação	Padrão
PM	6,5 ^b	1,4	7,1 ^a	1,3	8,1 ^a	0,8
25C	6,6 ^b	1,3	7,1 ^a	1,8	7,8 ^a	0,8
50C	5,7 ^c	1,5	7,3 ^a	1,1	7,7 ^a	0,9
25M	7,7 ^a	0,9	4,3 ^b	1,1	7,9 ^a	0,8
50M	6,9 ^b	1,7	6,8 ^a	1,6	6,4 ^b	2,0

* médias seguidas de mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si a $p \leq 0,05$.

PM: puro malte, 25C: cerveja elaborada com 25% de caldo de cana; 50C: cerveja elaborada com 50% de caldo de cana; 25M: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; 50M: cerveja elaborada com 50% de melado de cana.

Figura 24 – Escores hedônicos para os três grupos de aceitação quanto à cor das cervejas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto à aceitação do atributo COR, 49% dos consumidores preferiram significativamente a cerveja 25M em relação a todas as demais amostras ($p \leq 0,05$), 38% rejeitaram a cor da cerveja 50M e gostaram igualmente das demais, enquanto que um grupo menor, representando 13% da população, não gostou da cor da cerveja 25M.

A Tabela 21 mostra as médias dos escores hedônicos para o atributo APARÊNCIA da cerveja para os três grupos (segmentados quanto às suas preferências e rejeições) e a

diferença estatística entre elas nos diferentes produtos testados. Também é possível visualizar as médias na Figura 25.

Tabela 21 – Escores hedônicos médios para os três grupos de aceitação quanto ao atributo aparência da cerveja.

Cervejas	Grupo 1 (47%)		Grupo 2 (32%)		Grupo 3 (21%)	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
	Aceitação	Padrão	Aceitação	Padrão	Aceitação	Padrão
PM	7,8 ^a	0,9	7,0 ^b	1,2	5,9 ^{bc}	1,7
25C	7,7 ^a	0,9	6,7 ^b	1,8	7,7 ^a	0,8
50C	7,6 ^a	0,9	5,4 ^c	1,3	6,4 ^{bc}	1,3
25M	7,7 ^a	0,9	7,9 ^a	0,7	5,6 ^c	1,9
50M	7,6 ^a	1,2	5,5 ^c	1,3	6,8 ^{ab}	1,5

* médias seguidas de mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si a $p \leq 0,05$.

PM: puro malte, 25C: cerveja elaborada com 25% de caldo de cana; 50C: cerveja elaborada com 50% de caldo de cana; 25M: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; 50M: cerveja elaborada com 50% de melado de cana.

Figura 25 – Escores hedônicos para os três grupos de aceitação quanto à aparência das cervejas.

Fonte: Arquivo pessoal.

A análise da aceitação do atributo APARÊNCIA também segmentou em 3 grupos, observando-se que 47% gostaram igualmente da aparência de todas as cervejas, 32%

preferiram significativamente a cerveja 25M em relação a todas as demais amostras ($p \leq 0,05$). O grupo 3, representando 21% dos consumidores, é o mais heterogêneo quanto às preferências, observando-se valores altos de desvio padrão para as amostras PM, 25M e 50M. Esse grupo preferiu a aparência da cerveja 25C em relação às cervejas PM, 50C e 25M, porém não diferiu da 50M. Outra questão que precisa ser considerada na heterogeneidade ainda encontrada no grupo 3 é a diferença na percepção e na valorização dos diferentes atributos secundários da aparência que o consumidor pode atribuir, como a quantidade e a consistência visual da espuma, borbulhas, entre outros.

A Figura 26 apresenta os histogramas e a classificação dos escores hedônicos obtidos para a COR e para a APARÊNCIA das cervejas.

Figura 26 – Histograma e classificação dos escores hedônicos obtidos para a cor e aparência das cervejas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto à classificação dos escores hedônicos para a COR, as cervejas 25M e 25C foram as que obtiveram maior proporção de notas na região de aceitação (valores ≥ 7), 80% e 75%, respectivamente. E as cervejas que apresentaram a maior proporção na região de rejeição da cor (valores ≤ 4), ambas de 13%, foram as cervejas 50C e 50M. Observa-se também que a proporção real de rejeição à cor da cerveja 25%M é de 6%, considerando-se que a porcentagem de 13% encontrada para o grupo 2 na análise de agrupamentos pelas similaridades dos gostos e desgostos inclui outras combinações quanto às comparações entre as 5 amostras, inclusive nem sempre com a homogeneidade desejada, mas serve para complementar a interpretação dos resultados sob o aspecto geral de segmentação, ou seja, seguindo-se a recomendação de que agrupamentos com menos de 10% dos consumidores não são significativos (GUINARD, 2006).

Fazendo uma relação com a análise de cor mostrada anteriormente na Tabela 14 do item 3.1., nota-se que os consumidores preferiram cervejas mais escuras, visto que as cervejas 25M e 25C tiveram valores de 12,35 e 11,04 EBC, respectivamente, enquanto as cervejas 50%C e 50%M apresentaram valores 7,91 e 9,21 EBC, respectivamente.

A classificação dos escores hedônicos para a APARÊNCIA foi muito similar, ou seja, as cervejas 25C e 25M foram as que obtiveram maior proporção de notas na região de aceitação (valores ≥ 7), de 81% e 78%, respectivamente. E as cervejas que apresentaram a maior proporção na região de rejeição da aparência (valores ≤ 4) foram as cervejas 50C e 50M, de 8% e 9%, respectivamente. A mesma observação anterior para a proporção real de rejeição à aparência da cerveja 25M ser de 7%, e não de 21%, se aplica aqui. A porcentagem de 21% encontrada para o grupo 3 no agrupamento pelas similaridades dos gostos e desgostos inclui outras combinações na comparação entre as 5 amostras, nem sempre com a homogeneidade desejada, mas serve para complementar a interpretação dos resultados sob o aspecto geral de segmentação.

3.3.2. Análise da aceitação do atributo sabor

A Tabela 22 mostra as médias dos escores hedônicos para o atributo SABOR da cerveja para os três grupos (segmentados quanto às suas preferências e rejeições) e a diferença estatística entre elas nos diferentes produtos testados. Também é possível visualizar as médias na Figura 27.

Tabela 22 – Escores hedônicos médios para os três grupos de aceitação quanto ao atributo sabor das cervejas.

Cervejas	Grupo 1 (52%)		Grupo 2 (34%)		Grupo 3 (14%)	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
	Aceitação	Padrão	Aceitação	Padrão	Aceitação	Padrão
PM	7,2 ^a	1,0	5,3 ^b	1,8	6,1 ^a	1,9
25C	7,0 ^a	1,3	7,0 ^a	1,8	6,4 ^a	1,8
50C	6,5 ^b	1,6	4,9 ^b	1,8	6,2 ^a	1,9
25M	7,4 ^a	0,9	7,3 ^a	0,7	3,6 ^b	0,9
50M	7,4 ^a	1,1	5,4 ^b	1,5	5,4 ^a	1,7

* médias seguidas de mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si a $p \leq 0,05$.

PM: puro malte, 25C: cerveja elaborada com 25% de caldo de cana; 50C: cerveja elaborada com 50% de caldo de cana; 25M: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; 50M: cerveja elaborada com 50% de melado de cana.

Figura 27 – Escores hedônicos para os três grupos de aceitação quanto à sabor das cervejas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto à aceitação do atributo SABOR, 52% dos consumidores rejeitaram o sabor da cerveja 50C e gostaram igualmente das demais, 34% preferiram significativamente o sabor das cervejas 25C e 25M em relação às outras três amostras, enquanto que 14% não gostaram do sabor da cerveja 25M.

A Figura 28 apresenta os histogramas e a classificação dos escores hedônicos obtidos para o SABOR das cervejas em análise.

Figura 28 – Histograma e classificação dos escores hedônicos obtidos para o sabor das cervejas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto à classificação dos escores hedônicos para o SABOR, as cervejas 25M e 25C foram as que obtiveram maior proporção de notas na região de aceitação (valores ≥ 7), 74% e 67%, respectivamente. A cerveja 50C apresentou a maior proporção, considerada alta (23%), na região de rejeição do sabor (valores ≤ 4), e as cervejas 50M e PM, ambas, também apresentaram uma proporção importante de rejeição, de 16%.

Na Tabela 17 do item 3.1.3., verifica-se que a cerveja 25M foi a que teve a menor concentração de aldeídos, enquanto as cervejas 50C e 50M foram as que tiveram maiores concentrações desses compostos. Isso pode ter influenciado na avaliação do atributo sabor em questão, já que os aldeídos provocam sabores desagradáveis nas cervejas de um modo geral.

3.3.3. Análise da aceitação do atributo odor

A Tabela 23 mostra as médias dos escores hedônicos para o atributo ODOR da cerveja e a diferença estatística entre elas nos diferentes produtos testados.

Tabela 23 – Escores hedônicos médios para o atributo odor das cervejas.

Cervejas	Média	Desvio
	Aceitação	Padrão
PM	6,6 ^a	1,6
25C	6,6 ^a	1,5
50C	6,2 ^b	1,7
25M	7,1 ^a	1,5
50M	6,6 ^a	1,8

* médias (n=120) seguidas de mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si a $p \leq 0,05$.

PM: puro malte, 25C: cerveja elaborada com 25% de caldo de cana; 50C: cerveja elaborada com 50% de caldo de cana; 25M: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; 50M: cerveja elaborada com 50% de melado de cana.

Quanto à aceitação do ODOR, a cerveja 50C foi rejeitada significativamente em relação a todas as demais amostras ($p \leq 0,05$). Os valores dos desvios padrão das médias encontram-se dentro de valores esperados para testes afetivos, considerando-se 120 casos (DUTCOSKY, 2013).

A Figura 29 apresenta os histogramas e a classificação dos escores hedônicos obtidos para o ODOR das cervejas em análise.

Figura 29 – Histograma e classificação dos escores hedônicos obtidos para o odor das cervejas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto à classificação dos escores hedônicos para o ODOR, a cerveja 25M obteve a maior proporção de aceitação (valores ≥ 7), por 72% dos consumidores. A cerveja 50C apresentou a maior proporção na região de rejeição do aroma (valores ≤ 4), de 16%.

3.3.4. Análise da impressão global das cervejas

A Tabela 24 mostra as médias dos escores hedônicos para o atributo IMPRESSÃO GLOBAL das cervejas e a diferença estatística entre elas nos diferentes produtos testados.

Tabela 24 – Escores hedônicos médios para o atributo impressão global das cervejas.

Cervejas	Média	Desvio
	Aceitação	Padrão
PM	6,8 ^{ab}	1,36
25C	7,0 ^a	1,24
50C	6,5 ^b	1,47
25M	7,1 ^a	1,36
50M	6,7 ^{ab}	1,51

* médias (N=120) seguidas de mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si a $p \leq 0,05$.

PM: puro malte, 25C: cerveja elaborada com 25% de caldo de cana; 50C: cerveja elaborada com 50% de caldo de cana; 25M: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; 50M: cerveja elaborada com 50% de melado de cana.

Quanto à aceitação GLOBAL, as cervejas 25M e 25C foram significativamente preferidas em relação à cerveja 50C ($p \leq 0,05$).

A Figura 30 apresenta os histogramas e a classificação dos escores hedônicos obtidos para a IMPRESSÃO GLOBAL das cervejas em análise.

Figura 30 – Histograma e classificação dos escores hedônicos obtidos para a impressão global das cervejas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto à classificação dos escores hedônicos para a IMPRESSÃO GLOBAL, a cerveja 25M obteve a maior proporção de valores ≥ 7 , por 77% dos consumidores. A cerveja 50C apresentou a maior proporção na região de rejeição (valores ≤ 4), de 12%.

O mapa da preferência dos consumidores e a relação entre as cervejas em análise é demonstrado por análise de componente principal (ACP) na Figura 31, onde observamos que os dois primeiros componentes principais explicaram uma variação de 55,73%.

Com o auxílio da classificação e histograma dos escores hedônicos juntamente com a ACP da impressão global consegue-se discriminar que a cerveja 25M foi preferida.

Verifica-se que para a opção “certamente compraria”, a maior porcentagem (32% dos consumidores) foi maior para a cerveja 25M. Já para a opção “provavelmente compraria” a cerveja 25C foi a que teve maior valor, com 46% dos consumidores que provavelmente comprariam essa bebida.

A cerveja 50C foi a menos aceita em relação à atitude de compra, desagradando 23% dos consumidores para o item “provavelmente não comprariam”.

As amostras 25C e 25M foram as mais aceitas dentre as “formulações” analisadas, segundo o Teste de Atitude de Compra.

Figura 32 – Representação gráfica dos resultados do teste de aceitação em relação à atitude de compra.

PM: puro malte, 25C: cerveja elaborada com 25% de caldo de cana; 50C: cerveja elaborada com 50% de caldo de cana; 25M: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; 50M: cerveja elaborada com 50% de melado de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Na análise geral dos atributos, por diferença entre as médias por ANOVA, por histograma e classificação dos escores hedônicos e também pela atitude de compra, podemos concluir que a cerveja com 25% de melado de cana foi a mais aceita para a maioria dos consumidores.

4. CONCLUSÕES

Houve variações das características físico-químicas entre as diferentes cervejas elaboradas, com destaque para os níveis de FAN que foram mais baixos nas cervejas com maior proporção de adjuntos (50% de caldo e 50% de melado).

A cerveja puro malte não foi capaz de alcançar as atenuações finais e níveis de álcool como as cervejas produzidas com adjunto e, além disso, foi a cerveja que apresentou a coloração mais intensa em relação às demais.

Os açúcares estiveram em baixas concentrações em todas as cervejas devido ao seu consumo durante a fermentação.

Para a maioria dos álcoois superiores avaliados, houve um aumento em sua produção nas cervejas com adjunto. E o acetato de etila foi o éster presente em maior concentração em todas as cervejas avaliadas.

A cerveja com adição de 25% de melado, que foi a cerveja mais aceita no teste sensorial, apresentou as menores concentrações de todos os aldeídos avaliados. Já a cerveja puro malte mostrou uma composição maior de aminoácidos.

Verificou-se um aumento dos níveis de compostos fenólicos e atividade antioxidante quando houve um aumento na adição do adjunto, seja ele caldo ou melado de cana. Também foi verificada uma correlação positiva entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante para as cervejas produzidas.

Considerando os resultados do Teste de Aceitação e do Teste de Atitude de Compra elegeu-se a cerveja com 75% de malte e 25% de melado de cana como o produto mais aceito em termos de características sensoriais.

A cerveja menos aceita, no caso, a com adição de 50% de caldo de cana, foi à que apresentou, na grande maioria das vezes, níveis mais elevados de aldeídos, que são substâncias indesejáveis na bebida.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, A. M.; GUILLÉN, D. A.; BARROSO, C. G.; PUERTAS, B.; GARCIA, A. Determination of antioxidant activity of wine by products and its correlation with polyphenolic content. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 5832-5836, 2002.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, p. 183-198, 2002.
- ARAÚJO, F. B.; SILVA, P. H. A.; MINIM, V. P. R. Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 121-128, 2003.
- BIRCH, A.E.; FENNER, G. P.; WATKINS, R.; BOYD, L. C. Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 4502-4507, 2001.
- BOULTON, C. C.; BOX, W. G.; QUAIN, D. E.; MOUZAHN, S. W. Vicinal diketone reduction as a measure of yeast vitality. **MBAA Technical Quarterly**, v. 38, n. 2, p. 89-93, 2001.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie**, v. 22, p. 25-30, 1995.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317-333, 1998.
- CARDELLO, H. M. A. B. **Análise sensorial de aguardentes**. In: BRAZILIAN MEETING ON CHEMISTRY OF FOOD AND BEVERAGES, 1999. Araraquara. **Book of Abstracts**, Gráfica UNESP, 1999.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.
- DELLA LUCIA, S. M.; MINIM, V. P. R. Grupo de foco. In: MINIM, V. P. R. **Análise sensorial: estudos com consumidores**. Viçosa: Editora. UFV, 2006. cap. 4, p. 85-108.

DELLA LUCIA, S. M. **Métodos estatísticos para avaliação da influência de características não sensoriais na aceitação, intenção de compra e escolha do consumidor.** 2008. 116f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa- MG, 2008.

DERDELINCKX, G. Polyphenols in wort and beer: state of the art in 2008: where and why? **Cerevisia Belgian Journal of Brewing and Biotechnology**, v. 33, p. 174-187, 2008.

DE ROUCK, G. **System changes in wort production for the improvement of the flavor stability of lager beer.** 2013. 135f. Thesis (Doctor in Bioscience Engineering) – Faculty of Bioscience Engineering, KU Leuven, Belgium, 2013.

DUARTE-ALMEIDA, M.J.; NOVOA, A.V.; LINARES, A.F.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Antioxidant activity of phenolics from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 61, p. 187-192, 2006.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**, Curitiba: Editora Champagat, 1996. 122p.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**, Curitiba: Editora Champagat, 2013. 531p.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **Analytica-EBC**. Fachverlag Hans Carl. Nuremberg. EBC Analysis Committee. 2000.

FANTOZZI, P.; MONTANARI, L.; MANCINI, F.; GASBARINI, A.; ADDOLORATO, G.; SIMONCINI, M.; NARDINI, M.; GHISELLI, A.; SCACCINI, C. In vitro antioxidant capacity from wort to beer. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 31, p. 221-227, 1998.

FREITAS, G. L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Avaliação da atividade antioxidante de diferentes cervejas aplicando os métodos ABTS e DPPH. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 303-307, 2006.

FUMI, M. D.; GALLI, R.; LAMBRI, M.; DONADINI, G.; FAVERI, D. M. Effect of full-scale brewing process on polyphenols in Italian all-malt and maize adjunct lager beers. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 568-573, 2011.

GASOWSKI, B.; LEONTOWICZ, M.; LEONTOWICZ, H.; KATRICH, E.; LOJEK, A.; CIZ, M.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. The influence of beer with different antioxidant potential on plasma lipids, plasma antioxidant capacity, and bile excretion of rats fed cholesterol-containing and cholesterol-free diets. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, n. 9, p. 527-533, 2004.

GUINARD, J.-X. **Consumer testing methods**. California: UC Davis Extension, 2006b. Course 3. Applied Sensory Science and Consumer Testing Certificate Program for Distance Learners.

GUIMARÃES, C. M.; GIÃO, M. S.; MARTINEZ, S. S.; PINTADO, A. I.; PINTADO, M. E.; BENTO, L. S.; MALCATA, E. X. Antioxidant activity of sugar molasses, including protective effect against DNA oxidative damage. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 39-43, 2007.

HAIR, J. R. et al. **Análise multivariada de dados**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2005.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n.8, p.253-265, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Clarendon, Oxford, 2000.

HARDWICK, W. A. **Handbook brewing**. New York: Marcel Dekker, 1994. 714p.

KABELOVÁ, I.; DVOŘÁKOVÁ, M.; ČÍŽKOVÁ, H.; DOSTÁLEK, P.; MELZACH, K. Determination of free amino acids in beers: a comparison of Czech and foreign brands. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 736-741, 2008.

KADAM, U. S.; GHOSH, S. B.; STRAYO D.; SUPRASANNA, P.; DEVASAGAYAM, T. P. A.; BAPAT, V. A. Antioxidant activity in sugarcane juice and its protective role against radiation induced DNA damage. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1154-1160, 2008.

KLOSE, Ç.; MAUCH, A.; WUNDERLICH, S.; THIELE, F.; ZARNKOW, M.; JACOB, F.; ARENDT, E. K. Brewing with 100% oat malt. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, p. 411-421, 2011.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; GARCÍA-PARILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciência e Tecnologia e Alimentos**, v. 24, n.4, p. 691-693, 2004.

LUGASI, A. Polyphenol content and antioxidant properties of beer. **Acta Alimentaria**, v. 32, n. 2, p. 181-192, 2003.

MALFLIET, S.; VAN OPSTAELE, F.; DE CLIPPELEER1, J.; SYRYN, E.; GOIRIS, K.; DE COOMAN, L.; AERTS, G. Flavor instability of pale lager beers: determination of analytical markers in relation to sensory ageing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, p. 180-192, 2008.

MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-47, 2004.

MEILGAARD, M. C. Flavor chemistry of beer. I. Flavor interaction between principal volatiles. **Technical Quarterly of the Master Brewers Association of America**, v. 12, p. 107-117, 1975.

MEILGAARD, M. C.; PEPPARD, T. L. The flavor of beer. Developments in Food Science. In: MORTON I. D.; MACLEOD, A. J. Editors. **Food Flavors**, Part B. Oxford: Elsevier, 1986, v. 3. p. 99-170.

MEILGAARD, M. Effects on flavor of innovations in brewery equipment and processing: a review. **Effects on Flavor of Innovations in Brewery Equipment and Processing**, v. 7, n. 5, p. 271-286, 2001.

MUNROE, J. H. 1994. Fermentation. In "HANDBOOK of brewing". Hardwick, W. A. Ed. New York. Marcel Dekker, p. 323-354.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n.1-2, p. 95-111, 2004.

NAGAO, Y.; KODAMA, H.; YAMAGUCHI, T.; YONEZAWA, T.; TAGUCHI, A.; FUSHIKI, T. Reduced urination rate while drinking beer with an unpleasant taste and off flavor. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 63, p. 468-473, 1999.

NGAPO, T. M.; DRANSFIELD, E.; MARTIN, J. F.; MAGNUSSON, M.; BREDAHL, L.; NUTE, G. R. Consumer perceptions: pork and pig production. Insights from France, England, Sweden and Denmark. **Meat Science**, v. 66, n. 1, p. 125-134, 2003.

NOGUEIRA, L. C.; SILVA, F.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; TRUGO, L. C. Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, p. 207-210, 2005.

PAYET, B.; SING, A. C.; SMADIA, J. Comparison of the concentrations of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 7270-7276, 2006.

PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; COLOMBI, B.; DEL RIO, D.; SALVATORE, S. Total antioxidant capacity of plants foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 2812-2819, 2003.

PERPÈTE, P.; SANTOS, G.; BODART, E.; COLLIN, S. Uptake of amino acids during beer production: the concept of a critical time value. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 63, p. 23-27, 2005.

PETERSEN, E. E.; MARGARITIS, A.; STEWART, R. J.; PILKINGTON, P.H.; Mensour, N. A. The effects of wort valine concentration on the total diacetyl profile and levels late in batch fermentations with brewing yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 62, p. 131-139, 2004.

POMILIO, A. B.; DUCHOWICZ, P. R.; GIRAUDO, M. A.; CASTRO, E. A. Amino acid profiles and quantitative structure–property relationships for malts and beers. **Food Research International**, v. 43, p. 965-971, 2010.

QINGMING, Y.; XIANHUI, P.; WEIBAO, K.; HONG, Y.; YIDAN, S.; LI, Z., YANAN, Z.; YULING, Y.; LAN, D.; GUOAN, L. Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeum vulgare* L.) toward various oxidative stress in vitro and in vivo. **Food Chemistry**, v. 118, p. 84-89, 2010.

RAHMAN, I.; ADCOCK, I. M. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. **European Respiratory Journal**, v. 28, p. 219-242, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; MIN YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

SAISON, D.; DE SCHUTTER, D. P.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. R. Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5061-5068, 2009.

SAURA, F.D.; CAMBRODÓN, I. G.; MARTÍN, C.; PULIDO, R. Fibra dietética en cerveza: contenido, composición y evaluación nutricional (2º parte y final). **Cerveza e Salud**, v. 159, p. 61-67, 2003.

SILVA, G. A. D.; AUGUSTO, F.; POPPI, R. J. Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS-SPME-GC. **Food Chemistry**, v. 111, p. 1057-1063, 2008.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JR., J. A. Colorimetry of total phenolics with phomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

ŠMOGROVIČOVÁ, D.; DÖMÉNY, Z. Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilised yeasts. **Process Biochemistry**, v.34, p.785-794, 1999.

SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A. M.; REZAEI, K. Advanced analytical methods for the analysis of chemical and microbiological properties of beer. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 19, n. 2, p. 202-222, 2011.

TAKARA, K.; USHIJIMA, K.; WADA, K.; IWASAKI, H.; YAMASHITA, M. Phenolic compounds from sugarcane molasses possessing antibacterial activity against cariogenic bacteria. **Journal of Oleo Science**, v. 56, p. 611-614, 2007.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. The chemistry of beer aging: a critical review. **Food Chemistry**, v. 95, p. 357-381, 2006.

VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G.; DUFOUR, J.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M.; PRETORIUS, I. S.; DELVAUX, F. R. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 110-118, 2003.

VESELY, P.; LUSK, L.; BASAROVA, G.; SEABROOKS, J.; RYDER, D. Analysis of aldehydes in beer using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas

chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 6941-6944, 2003.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 4083-4089, 2001.

CAPÍTULO 4 – PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ANÁLISE SENSORIAL DE CERVEJA COM 25% DE MELADO DE CANA

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, cervejas do tipo Pilsen representam 98% do mercado consumidor com apenas uma pequena parcela de escolha por outros tipos de cerveja (SILVA; FARIA, 2008). Enquanto a valorização das cervejas do tipo Pilsen pelos consumidores muitas vezes é subjetiva, tendo em vista as semelhanças sensoriais entre elas, a preferência dos consumidores por cervejas especiais cobre uma gama muito mais ampla, devido aos aromas e sabores amplamente variáveis que, em geral, levam a pessoa a diferentes experiências (BAMFORTH, 2006).

O consumo de cerveja tem aumentado de forma constante nas últimas décadas, mesmo em países onde bebidas alcoólicas não são tradicionais. Em 2005, a produção mundial foi de aproximadamente $1,6 \times 10^{11}$ L, com quase 25 L per capita e aumento de 3% comparado com 2004. Os cinco principais países produtores de cerveja são a China, EUA, Alemanha, Brasil e Rússia, responsáveis por mais de 50% da produção (SILVA; AUGUSTO; POPPI, 2008).

Os adjuntos na produção de cerveja podem ser definidos como qualquer fonte de carboidrato, diferente do malte, que contribui com açúcares fermentescíveis para o mosto (STEWART, 2000). O uso de adjuntos na fabricação de cerveja é permitido por lei em muitos países e há vários tipos de matérias primas permitidas (ENGLMAN; MIEDANER, 2005).

A escolha da elaboração de uma cerveja Pilsen com adição de melado de cana na concentração de 25% é interessante, visto que é uma proporção muito utilizada nas cervejarias. Além disso, o melado pode baratear a produção de cerveja, reduzindo o uso de malte e também conferir características sensoriais importantes ao produto final.

Este trabalho teve como objetivo produzir em escala piloto uma cerveja com 75% de malte e 25% de melado de cana, e posterior acompanhamento do processo fermentativo e caracterização da bebida, com avaliação das características físico-químicas, sensoriais e propriedades de envelhecimento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A produção foi conduzida nas instalações da Planta Piloto de Bebidas da Escola de Engenharia de Lorena em escala piloto para um volume de 200 litros. As análises foram realizadas no Laboratório de Enzima, Fermentação e Tecnologia Cervejeira (EFBT) da Universidade KU Leuven – Campus KAH0 Sint – Lieven, Ghent, na Bélgica.

4.1.Material

A água utilizada no processo cervejeiro foi obtida do poço artesiano que abastece a Escola de Engenharia de Lorena. O malte utilizado foi o claro do tipo Pilsen, doado pela Malteria do Vale S/A, de Taubaté, SP. O lúpulo do tipo Saaz foi fornecido pela Vallerstein Industrial Ltda de São Paulo, SP. O melado de cana utilizado foi adquirido da empresa Caseiro e Natural Alimentos Ltda, Biguaçu, SC, e a linhagem da levedura utilizada para a fermentação foi o *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, do tipo *lager*, identificada pela Universidade Federal de Lavras, MG.

4.2.Métodos

4.2.1. Preparação do mosto

O mosto cervejeiro foi preparado nos equipamentos da Planta Piloto de Bebidas da Escola de Engenharia de Lorena, SP (Figura 33).

Figura 33 – Planta piloto de preparação do mosto e fermentação cervejeira da Escola de Engenharia de Lorena – USP.

T1: tanque de água quente, T2: tina de mosturação, T3: tina de filtração, T4: tina de fervura, P: bombas, S: chuveiros (sistema de limpeza da linha), Ru: unidade de refrigeração, R1: fermentador/maturador, I e II: pontos de amostragem ou produto final, 1: adição de água, 2: adição de malte, 3: adição de lúpulo e do melado de cana, 4: adição de ar/O₂.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.2.2. Moagem do malte

O malte de cevada foi passado por moinho de rolos motorizado, com distanciamento entre os rolos calibrado em 0,7 mm, por duas vezes consecutivas para obtenção da granulometria adequada para a mosturação.

4.2.3. Mosturação

A brassagem foi conduzida na tina de mosturação (T2), utilizando-se 33,20 kg de malte e um volume de 100 litros de água primária, que foi previamente aquecida no tanque de água T1.

A temperatura variou de 48 a 78°C e o pH inicial foi ajustado para 5,5 pela adição de ácido láctico (Synth). Foi adicionado CaCl₂ (Synth) na proporção de 1,26 g/Kg de malte.

O perfil de tempo e temperatura de ativação de cada enzima foi de 48, 52, 63, 70 e 78°C por 20, 20, 60, 30 e 10 minutos, respectivamente.

4.2.4. Filtração do mosto

Após o término da hidrólise durante a brassagem, o mosto foi transportado para a tina de filtração (T3), para separação das cascas e demais resíduos do mosto.

Após o recolhimento de todo o líquido mosturado, a camada filtrante foi lavada com água secundária a 80°C, para a extração dos açúcares residuais impregnados nas cascas do malte e obtenção de um mosto com extrato original de 16°P.

4.2.5. Fervura do mosto

Após a transferência do mosto misto para a tina de fervura (T4), foi adicionado 9,77 Kg de melado de cana que estava na concentração de 74°Brix.

Durante a fervura, foi adicionado lúpulo na forma de pellets, em proporções de 1,8 g/L no mosto, sendo que no início da fervura foi acrescentado o lúpulo na concentração de 0,9 g/L em relação ao volume final e 0,9 g/L nos 15 minutos antes de completar o tempo de fervura total que foi de 1 hora.

Esse tempo de 1 hora foi suficiente para atingir concentração do mosto de 16°P.

Após o término da fervura, o mosto foi resfriado para que ocorresse a formação de aglomerados proteicos comumente conhecidos como *trub*, e aguardado aproximadamente 1 minuto para que o líquido ficasse totalmente em repouso, e o *trub* pudesse ser retirado. O mosto foi resfriado até atingir a temperatura de fermentação de 12°C e enviado ao fermentador (R1).

4.2.6. Preparação do meio de cultivo e pré-inóculo

Da cultura estoque da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, cultivada em tubos de ensaio contendo meio inclinado de ágar extrato de malte (Merck), e conservada a 4°C, por 48 horas, foi feita a transferência das células em condições assépticas para um erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de mosto na concentração de 6°P. O cultivo foi realizado em mesa agitadora refrigerada (Cientec) sob agitação constante a 200 rpm e temperatura de 30°C até que a concentração de açúcares chegasse a 3°P. Em seguida este volume de meio foi transferido para um erlenmeyer de 6 litros, contendo 1,8 litros de

mosto na concentração de 12°P. O cultivo foi colocado sob agitação, a 200 rpm, até que concentração de açúcares abaixasse para 6°P.

O próximo passo foi transferir o volume de 1,8 L para um erlenmeyer de 6000 mL com 4000 mL de mosto a 16°P, também sob agitação constante a 200 rpm e temperatura de 30°C, e o tempo de cultivo deste inóculo foi mantido até que a concentração celular alcançasse aproximadamente 10^7 células/mL.

4.2.7. Fermentação

O fermentador utilizado foi o de aço inoxidável alimentício 304, com controle digital de temperatura e manômetro de pressão analógico para controle da pressão interna, exercida pela formação de CO₂.

A fermentação foi iniciada com uma concentração celular de $1,6 \times 10^7$ células/mL, em um mosto na concentração de 16°P.

A fermentação foi conduzida à 12°C, inicialmente com o registro de controle de pressão aberto, para saída do excesso de CO₂, e quando a concentração de açúcares atingiu, 1°P, acima da atenuação limite, os registros dos tanques foram fechados para manutenção do CO₂, e a pressão interna nos tanques foram mantidas em aproximadamente 2 kgf/cm².

4.2.8. Maturação

No final da fermentação, a temperatura foi reduzida para 4°C e a maturação foi conduzida por 15 dias.

4.2.9. Filtração

A bebida obtida foi submetida à filtração em um filtro do tipo prensa horizontal, com auxílio de filtro de celulose e terra diatomácea como elemento filtrante.

4.2.10. Engarrafamento e pasteurização

A cerveja obtida após a filtração foi diluída com água previamente carbonatada até atingir a concentração de 12°P, ou seja, para valores de uma cerveja Pilsen comum. Logo

após, foi armazenada em garrafas de coloração âmbar com capacidade de 600 mL e em seguida pasteurizadas por 62°C por 20 minutos, em banho-maria.

As cervejas frescas foram submetidas às análises físico-químicas e sensoriais, e a algumas garrafas foram armazenadas no escuro por 9 meses a 22°C, para averiguar o seu envelhecimento.

4.2.11. Análises realizadas durante a fermentação

Durante todo o processo de fermentação foram retirados 20 mL de amostras, periodicamente a cada 8 horas.

Inicialmente foram medidos o pH das amostras em pHmetro de bancada MA-522 (Marconi) e em seguida, as mesmas foram desgaseificadas pela agitação vigorosa dos tubos durante 1 minuto.

O sobrenadante obtido após a centrifugação a 4000 rpm por 20 min foi utilizado para quantificar o extrato aparente (ou concentração aparente de açúcares totais), grau de fermentação aparente, etanol e densidade do mosto em um analisador de cerveja (Beer Analyser 2, ANTON-PAAR®, Áustria); e o resultado de açúcares, etanol e densidade foram expressos em °Plato, % v/v e g/mL respectivamente.

4.2.11.1. Análises microbiológicas

Foram feitas contagens de células em suspensão e viabilidade celular em câmara de Neubauer (1/400 mm² x 1/10 mm) e expressa em células/mL. A determinação da viabilidade celular (células viáveis e não viáveis) foi realizada pelo Método Internacional de coloração com azul de metileno segundo ASBC (1996), cujo resultado foi expresso em %.

A contagem de células em suspensão também foi feita por peso seco da massa de leveduras (expresso em g/L), onde as amostras (10 mL) foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos, recuperando-se a massa de células, que foi lavada com água destilada e centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos, e posterior secagem em estufa à 105°C até peso constante.

4.2.12. Análises físico-químicas da cerveja

Para a caracterização da bebida produzida, foram feitas as seguintes análises:

- Teor alcoólico, densidade e concentração da cerveja: foram determinados em um analisador de cerveja (Beer Analyser 2, ANTON-PAAR®, Áustria);
- pH – potenciometria utilizando pHmetro MA-522 (Marconi);
- As seguintes análises foram realizadas de acordo com métodos da “European Brewery Convention” – EBC, (2010): cor: 9.1; amargor: 9.8; FAN: 9.10; polifenóis totais: 9.11; flavonóides: 9.12; dicetonas vicinais: 9.24.1; CO₂: 9.28.3; ar total: 11.2.2 e turbidez: 9.30;
- Atividade antioxidante: segundo Araki et al. (1999);
- Espuma: segundo metodologia descrita em “Americam Society Brewing Chemists”, 1976;
- Ácidos orgânicos: determinado por RP-HPLC segundo Kordiš-Krapež et al., 2001;
- Ácido sórbico: segundo a metodologia descrita por Bui e Cooper, 1987;
- Análises realizadas de acordo com métodos do Instituto Adolfo Lutz (2005): cloreto: met. 028/IV, p. 112-113; sulfato: met. 241/IV, p. 450-451; acidez fixa e acidez volátil: cap. 28, met. 506, p. 887; acidez total: cap. 10, met. 253, p. 464; cinzas: cap. 4, met. 018, p. 105;
- Análises feitas de acordo com “Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists”, segundo Horwitz; Latimer; George (2010): dióxido de enxofre: cap. 47, met. 990.28, p. 29; cálcio, cobre, ferro, magnésio, potássio, sódio e zinco: cap. 50, met. 985.35 e 984.27, p. 15-18.

4.2.13. Determinação de açúcares

Os açúcares foram determinados utilizando o equipamento HPLC- DP1-DP9. Antes das análises, as proteínas foram removidas das amostras de cerveja por precipitação com reagente Carrez. Assim, 20 µL de reagente de Carrez I (106 g de ferrocianeto de potássio triidratado (K₄Fe(CN)₆.3H₂O em 1000 mL de água), 20 µL de reagente de Carrez II (220 g de acetato de zinco diidratado (Zn(CH₃COO)₂.2H₂O e 30 mL de ácido acético foram adicionados a 1 mL de cerveja previamente desgaseificada.

Após centrifugação a 11000 x g durante 5 minutos, as amostras de 20 µL foram injetadas em HPLC Waters 717. A quantificação dos açúcares foram obtidos utilizando uma coluna Nucleosil 100-5 NH₂ (250 x 4 mm de diâmetro interno; Macherey Nagel, Düren, Alemanha), que foi mantida a 30°C. Uma mistura de água/acetonitrila (33/67; v/v) foi utilizada como fase móvel utilizando uma bomba (Waters 616), com fluxo de 1 mL/min.

Os componentes foram detectados por um detector de índice de refração Waters 2414. A calibração foi realizada utilizando uma mistura de glicose e maltose, nas concentrações de 250 mg/L, 500 mg/L e 1000 mg/L de cada um dos componentes, respectivamente. Fatores de resposta relativos, em comparação com a maltose, foram determinados da maltotriose até a maltoheptaose e utilizados para a quantificação. A maltooctaose foi quantificada usando o mesmo fator de resposta da maltoheptaose.

4.2.14. Determinação de ésteres e álcoois superiores

As extrações de ésteres voláteis e álcoois superiores das cervejas foram determinados segundo Malfiet et al., 2008, com realização de micro extração em fase sólida (HS-SPME) durante 30 minutos a 40°C, utilizando uma fibra de 65 µm (PDMS-DVB). Os componentes foram separados e detectados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CGC/MS) (Dual Stage Quadrupolo (ITQ 1100), sistema GC/MS (Interscience Benelux). O ITQ 1100 foi acoplado a um ThermoFinnigan Trace GC (Interscience Benelux) equipado com um amostrador automático Combi-PAL, um injetor com um revestimento de vidro de entrada estreita (0,5 mL de volume), e uma coluna capilar de sílica fundida RTX-1 (40 m x 0,18 mm de diâmetro interno e 0,2 mm de espessura, Restek, Interscience Benelux).

O hélio foi o gás de arraste, a um fluxo de 0,8 mL/min. A temperatura do injetor foi de 230°C, em modo *split* 1:2. A temperatura da coluna foi mantida a 40°C durante 3 minutos, depois aumentada para 200°C a 6°C/min, seguida por um aumento até 250°C, a uma taxa de 15°C/min, e finalmente mantida a 250°C durante 3 minutos.

O processamento dos dados cromatográficos foi realizado utilizando o sistema de dados XcaliburTM (Thermo Electron Corporation). Para cada componente, uma curva de calibração foi feita a fim de quantificar cada componente presente nas cervejas.

4.2.15. Determinação de aldeídos

Os aldeídos voláteis da cerveja foram determinados de acordo com Vesely et al. 2003, utilizando-se de micro extração em fase sólida (HS-SPME) com fibras de PFBOA (o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzilo)hidroxilamina) e os componentes foram separados e detectados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CGC/MS) (Dual Stage Quadrupole (DSQ™ II) GC/MS sistema (Interscience Benelux)).

O DSQ™ II foi acoplado ao GC Ultra (Interscience Benelux) equipado com um amostrador automático CTC-PAL, com um injetor revestido de vidro estreito (0,5 mL de volume), e uma coluna capilar de sílica RTX-1 (40 m x 0,18 mm de diâmetro interno, 0,2 µm de espessura, Restek, Interscience Benelux). O processamento de dados foi realizado por meio do sistema de dados XCalibur™ (Thermo Electron Corporation).

4.2.16. Determinação do perfil de aminoácidos

A determinação dos aminoácidos foi feita segundo De Rouck (2013). O sistema de separação Acquity Ultra Performance LC (UPLC) foi utilizado para quantificar os aminoácidos livres nas cervejas. Antes da derivatização dos aminoácidos, as proteínas foram removidas. Assim, 20 µL de reagente de Carrez I (106 g de ferrocianeto de potássio trihidratado ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) em 1000 mL de água), 20 µL de reagente de Carrez II (220 g de acetato de zinco dihidratado ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) e 30 µL de ácido acético foram adicionados a 1 mL de cerveja. Depois disso, a amostra foi centrifugada num microtubo de Eppendorf de 2 mL durante 5 minutos. A derivatização das amostras foi feita utilizando o pacote Waters AccQ-Tag Ultra Química. A reação da derivatização requer a diluição com um tampão de borato, reação com ACQ, seguido de inativação do excesso de agente de derivatização. O pacote de derivatização de aminoácido Ultra AccQ-Tag, fornecido pela Waters continha todos os reagentes necessários.

A separação dos aminoácidos foi realizada utilizando o equipamento UPLC Acquity (Waters, Milford, EUA), que consiste de um detector PDA, forno, bomba de solvente binário, e uma coluna ultra-AccQ Tag™ (2,1 mm de diâmetro interno x 100 mm; Waters, EUA). O processamento dos dados foi feito pelo software Epower 2.

As condições cromatográficas foram as seguintes: AccQ-Tag Ultra Eluent A concentrado (diluído 10 vezes) (Waters, Milford, EUA); AccQ-Tag Ultra Eluent B (Waters,

Milford, EUA). Eluição: gradiente de eluição de acordo com Waters AccQ-Tag Ultra method. Tempo de análise: 9,5 minutos. Fluxo: 0,7 mL/min. Temperatura da coluna: 60°C.

4.2.17. Análise sensorial

A análise sensorial foi feita usando o teste de aceitação da bebida, e também comparando com duas cervejas de mercado. Essas cervejas comerciais eram claras do tipo Pilsen (*lager*), sendo a “marca 1” com utilização de adjunto (cereais não malteados) e a da “marca 2”, puro malte, conforme descrito nos rótulos. As duas cervejas foram descritas como as preferidas a partir de um questionário de recrutamento feito anteriormente com 120 voluntários.

O teste sensorial foi realizado conforme metodologia descrita por Meilgaard (2001). As amostras foram apresentadas em forma de blocos completos aos 112 consumidores recrutados, em uma sessão de aproximadamente 15 minutos.

As amostras de 40 mL foram servidas em copos de acrílico codificados com três dígitos, à temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$, acompanhadas de água, biscoito “cream cracker” e ficha de avaliação sensorial (APÊNDICE C).

Os testes sensoriais foram realizados em cabinas individuais com a utilização de luz branca no laboratório de Análise Sensorial da Microcervejaria da EEL. Os indivíduos que participaram do teste eram consumidores habituais de cerveja, com idade superior a 18 anos, que foram convidados por intermédio de informativos distribuídos nos *campi* da Escola de Engenharia de Lorena, a participar de forma voluntária.

Para avaliação da aceitação das amostras, foi utilizada a escala hedônica estruturada de 9 pontos, com a nota 9 significando gostei muitíssimo, a nota 5 significando não gostei nem desgostei, e a nota 1, desgostei muitíssimo. Os consumidores avaliaram a aceitação quanto aos seguintes atributos: aparência, cor, odor, sabor e impressão global das bebidas.

Simultaneamente, também foi avaliada a atitude de compra usando escala estruturada de 5 pontos, com a nota 5 significando certamente compraria e a nota 1, certamente não compraria (APÊNDICE C).

Os consumidores foram recrutados mediante o uso de questionário (APÊNDICE A). A execução da análise sensorial foi aprovada pelo comitê de ética (Número CAAE: 09231013.9.0000.5501) e os participantes tiveram que assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para participarem das análises (APÊNDICE B).

4.2.18. Análise dos resultados

Ao longo da fermentação, as amostras foram coletadas em duplicata e, para todas as análises foram calculadas médias e desvio padrão.

Foi realizada também a avaliação da produtividade e do rendimento da fermentação a partir das equações abaixo, de acordo com Borzani (1986) e Moser (1988):

(1) Produtividade Volumétrica em etanol (g/L.h):

$$Q_P = \frac{Pt - Pi}{t - ti}$$

(2) Rendimento em etanol (g/g):

$$Y_{P/S} = \frac{Pt - Pi}{Si - St}$$

Onde:

Si e St: Concentração de extrato aparente inicial e no tempo final t (g/L)

Pi e Pt: Concentração de etanol inicial e no tempo final t (g/L)

ti e t : Tempo inicial e tempo final t de fermentação (h)

Para os cálculos de rendimento e produtividade, a conversão de unidades das concentrações de extrato aparente (°P) e do etanol (%v/v) para (g/L), foram realizados de acordo com as equações abaixo, segundo Carvalho (2009).

$$\text{Extrato aparente (g/L)} = \text{Extrato aparente (°P)} \times \text{Densidade do mosto (g/mL)} \times 10$$

$$\text{Etanol (g/L)} = \text{Etanol (\%v/v)} \times 0,789 \text{ (g/mL)} \times 10$$

Onde: 0,789 (g/mL) é a densidade do etanol à 20°C.

Os dados referentes às comparações de rendimento e produtividade entre os ensaios foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para a comparação das médias, foi aplicado o teste de Tukey, ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Para a análise sensorial, a análise da distribuição dos escores hedônicos observados versus esperados para uma binomial, pelo teste qui-quadrado, foi realizada para cada amostra e para cada atributo, juntamente com o teste Kolmogorov-Smirnov antes da análise de variância (ANOVA) para cada conjunto de dados. Para os casos em que o teste Kolmogorov-Smirnov foi significativo, utilizou-se a análise de agrupamentos para segmentação, aplicando-se a análise de variância (ANOVA) posterior para os grupos homogêneos. O teste de Tukey foi adotado para identificar diferenças significativas entre as médias das amostras. Utilizou-se o programa *XLSTAT*. Diferenças entre as médias no nível de 5% ($p \leq 0,05$) foram consideradas significativas.

Para análise de agrupamentos utilizou-se uma combinação dos métodos: hierárquico e não hierárquico, recomendada por Hair e colaboradores (2005). Primeiro, uma técnica hierárquica pode estabelecer o número de agrupamentos, caracterizar os centros de agrupamentos e identificar quaisquer observações atípicas óbvias. Depois que os casos atípicos foram eliminados, as demais observações podem então ser agrupadas por um método não hierárquico com os centros de grupos dos resultados hierárquicos como os pontos sementes iniciais. Desse modo, as vantagens dos métodos hierárquicos são complementadas pela habilidade dos métodos não hierárquicos para “refinar” os resultados, pela possibilidade de alteração de pertinência a grupos.

Paralelamente, para auxiliar a interpretação dos resultados, utilizou-se o histograma dos escores hedônicos e a classificação das regiões de aceitação (proporção de escores ≥ 7) e de rejeição (proporção de escores ≤ 4) e a região da indiferença, também considerada neutra (proporção de escores 5 e 6).

Para o atributo impressão global foi desenvolvido mapa de preferência interno com base na análise fatorial de componentes principais – ACP – para posicionamento da relação entre os produtos e entendimento da expressão de preferência do consumidor para o grupo das cervejas em análise.

5. RESULTADOS

5.1. Fermentação pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01

A Figura 34 apresenta a evolução da concentração de extrato original do mosto, da concentração de etanol, do crescimento celular e do pH em um mosto com concentração de 16°P, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, e temperatura de fermentação de 12°C.

Figura 34 – Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (% v/v), células (10^7 cel/mL) e pH durante a fermentação de mosto com 75% malte e 25% melado de cana (16°P/12°C) utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01.

Fonte: Arquivo pessoal.

Verifica-se o consumo do extrato desde o início do processo e em torno de 24 horas inicia-se a formação de etanol. Antes disso, as leveduras ainda realizava respiração para obtenção de energia.

A medida que o tempo foi passando, houve queda nos valores de pH e o crescimento celular aumentou até atingir valores máximos próximo de 65 horas com uma subsequente queda a partir de então.

Pode-se observar na Figura 35, a concentração celular, expressa em células/mL e em g/L, além de valores de viabilidade celular (%).

Figura 35 – Crescimento celular (10^7 células/mL e g/mL) e viabilidade durante o processo fermentativo em mosto com 75% malte e 25% melado de cana (16°P/12°C) utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01.

Fonte: Arquivo pessoal.

Analisando a Figura 36, verifica-se um aumento da produtividade volumétrica e do rendimento em etanol em função do tempo de fermentação do mosto com adição de melado de cana.

A produtividade volumétrica em etanol na fermentação do mosto contendo melado de cana atingiu um valor máximo de 0,50 g/L.h, a partir do tempo de 56 h. O rendimento aparente em etanol nesse mesmo tempo foi de 0,30 g/g. Este resultado foi inferior ao rendimento em etanol, próximo de 0,40 g/g, obtido por Dragone, (2002), na fermentação conduzida em fermentadores cilindro-cônicos de 180 L com volume útil de 140 L, utilizando mostos de 17,50°P, fermentados por *Saccharomyces cerevisiae* do tipo *lager* à 12,5°C.

O aumento do rendimento em etanol durante a fermentação resulta da diminuição do rendimento em biomassa ($Y_{x/s}$). O fator que também pode influenciar na diminuição deste ($Y_{x/s}$) é a manutenção celular, ou seja, além do substrato estar sendo utilizado na formação dos produtos de fermentação, ele também é destinado ao desempenho de funções vitais que compreendem o trabalho osmótico para manter os gradientes de concentração de substâncias entre o interior da célula e o seu meio ambiente, as modificações de componentes celulares que requeiram energia e a mobilidade celular (CARVALHO, 2009).

Figura 36 – Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação do mosto a 16°P e 12°C, contendo 75% de malte e 25% de melado de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Outra característica ligada ao consumo do substrato e a formação de produtos é a queda gradual da densidade do mosto com melado de cana no decorrer da fermentação (Figura 37). Este fenômeno está inteiramente associado tanto ao consumo do substrato para a construção e manutenção celular como na formação de produtos menos densos e/ou voláteis. Um bom exemplo é a formação de CO_2 que provem da fermentação dos açúcares. Uma parte deste gás fica solúvel e outra deixa o mosto. Sabe-se que em concentrações apreciáveis no bioreator, o CO_2 inibe a fermentação. Este composto é recolhido da parte superior do reator, podendo ser reutilizado mais tarde com a finalidade de carbonatação da cerveja nas etapas finais (CARVALHO, 2009).

Figura 37 – Densidade do mosto com 75% de malte e 25% de melado de cana (16°P/12°C) utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01.

Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 42 verifica-se o grau aparente de fermentação (GAF) (%) ao longo de todo o processo fermentativo. O GAF no tempo final (152 h) foi de 79,90%, valor este, acima do intervalo de 68% a 75%, conforme verificado em SENAI (1997) para o início da etapa de maturação, ou seja, do fim da fermentação.

No entanto, com 68,96% de GAF, o tempo de fermentação era de apenas 88 h, ou seja, menos de 4 dias de fermentação. Nesse período a produtividade era de 0,45 g/L.h e um rendimento de 0,31 g/g.

Figura 38 – Grau Aparente de fermentação (%) utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação do mosto a 16°P e 12°C, contendo 75% de malte e 25% de melado de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.2. Análises físico-químicas

Os resultados das análises da cerveja com 25% de melado de cana diluída para aproximadamente 12°P e de uma cerveja puro malte estão apresentados na Tabela 25.

A cerveja de melado teve o teor de etanol de $5,58 \pm 0,04$ % (v/v), extrato aparente de $1,42 \pm 0,03$ g/100g, extrato original de $11,92 \pm 0,16$ g/100g e grau de fermentação aparente de $88,12 \pm 0,19$ %.

A cerveja é um produto suavemente ácido porque o malte de cevada clássico possui pH na faixa de 4-5 e as to tipo *ale* variam de 3-6. Os ácidos orgânicos, que são essencialmente subprodutos excretados pelas leveduras, são os responsáveis por esta acidez (ARAÚJO; SILVA; MINIM, 2003). O pH da cerveja em questão foi de $4,30 \pm 0,03$.

Tabela 25 – Caracterização da cerveja de melado de cana após diluição e comparação com cerveja puro malte.

		cerveja com 25% de melado	cerveja puro malte*
Etanol	v/v %	5,58 ± 0,04	5,30 ± 0,07
Extrato aparente	g/100g	1,42 ± 0,03	2,06 ± 0,15
Extrato original	g/100g	11,92 ± 0,16	12,39 ± 0,15
Grau aparente de fermentação	%	88,12 ± 0,19	83,4 ± 2,0
pH	-	4,30 ± 0,03	NA ^b
Acidez fixa	mL NaOH 1N/100mL	2,09 ± 0,00	NA ^b
Acidez total	mL NaOH 1N/100mL	2,36 ± 0,07	NA ^b
Acidez volátil	mL NaOH 1N/100mL	0,27	NA ^b
FAN	(mg/L)	85,3 ± 0,0	91,4 ± 5,8
Cor	EBC	12,88 ± 0,92	4,7 ± 0,1
Polifenóis totais	mg/L	225,5 ± 0,00	166,0 ± 1,00
Flavonóides totais	mg/L	16,2 ± 0,0	37,7 ± 1,2
TRAP	mM Asc. Eq.	1,80 ± 0,14	1,22 ± 0,03
Amargor	IBU	20,0	25,0 ± 2,4
CO ₂	g/L	4,90	5,6 ± 0,2
Dióxido de enxofre	mg/L	ND < 10,00 ^a	5,9 ± 1,0
Ar total	mL	3,80	NA ^b
Espuma	segundos	83,0	235,0 ± 6,00
Turbidez	EBC	5,00	NA ^b
Turbidez O°C	EBC	5,10	0,70 ± 0,18
Cloreto	mg/100mL	11,0 ± 0,8	NA ^b
Sulfato	g/L	ND < 0,7 ^a	NA ^b
Ácido sórbico	mg/L	ND < 1,00 ^a	NA ^b
Cinzas	g/100mL	5,66 ± 0,06	NA ^b

^a ND: não detectado; ^b NA: não avaliado

*Composição físico-química de cerveja puro malte de acordo com De Rouck (2013).

O conteúdo de FAN na cerveja de melado de cana foi de 85,3 ± 0,0 mg/L e a cor foi de 12,88 ± 0,92 EBC. A cor da cerveja puro malte elaborada por De Rouck foi de 4,7 ± 0,1 EBC, ou seja, bem mais clara que a cerveja do presente estudo.

A quantidade de polifenóis totais e de flavonóides foi de $225,5 \pm 0,0$ mg/L e de $16,2 \pm 0,0$ mg/L, respectivamente, e atividade antioxidante de $1,80 \pm 0,14$ mM Asc. Eq.

Não foi detectado na cerveja dióxido de enxofre, sulfato e ácido sórbico, visto que a cerveja aqui elaborada não teve nenhum aditivo. Já para a cerveja puro malte o dióxido de enxofre foi de $5,9 \pm 1,0$ mg/L.

Cervejas com pouco desprendimento de gás carbônico (seja por falta de carbonatação ou pela temperatura muito baixa do líquido) ou com pouca proteína levam à ineficiente formação de espuma. Compostos que aumentam a tensão superficial da cerveja fazem com que o líquido escorra com mais dificuldade por entre as bolhas de gás carbônico e, portanto, contribuem para estabilizar a espuma. O alginato de propilenoglicol é comumente adicionado à cerveja para esse fim (MATTOS, 2007).

A cerveja com melado de cana teve um tempo de retenção da espuma de 83 segundos, valor esse bem abaixo da cerveja puro malte, elaborada por De Rouck (2013), que apresentou retenção de $235,0 \pm 6,00$ segundos, porém esta cerveja foi produzida em diferentes condições tais como brassagem, fervura, etc.

A turbidez medida em temperatura ambiente e a medida à 0°C foram praticamente as mesmas, mas foram bem superiores ao valor obtido por De Rouck (2013), cuja cerveja elaborada teve valor de $0,70 \pm 0,18$ EBC.

A Tabela 26 demonstra algumas características da cerveja com melado de cana, de cerveja de banana e de algumas cervejas *lager* tipo Pilsen do mercado.

Tabela 26 – Caracterização da cerveja com melado de cana após diluição e comparação com cerveja de banana e cervejas do mercado.

Constituintes	Unidade	Cerveja com melado de cana	Cerveja com Banana ^a	Cervejas do Mercado
Dicetonas Vicinais Totais	mg/L	0,18 ± 0,01	0,89	0,06**
Potássio	mg/L	523,1 ± 0,22	600,68	200,00*
Cálcio	mg/L	60,7 ± 0,04	11,04	56,00*
Magnésio	mg/L	9,74 ± 0,13	156,94	60,00*
Sódio	mg/L	36,6 ± 0,30	72,68	80,00*
Ferro	mg/L	0,47 ± 0,004	1,12	< 0,10*
Cobre	mg/L	0,21 ± 0,002	< 0,05	< 0,16*
Extrato Aparente	°P	1,42 ± 0,03	3,13	2,50*
Etanol	% v/v	5,58 ± 0,04	4,8	3,90*
pH	-	4,30 ± 0,03	4,2	4,20*

Composição físico-química de cervejas de baixa fermentação do mercado de acordo com: (BRODERICK, 1977)*; (CRUZ, 2007)**; ^a CARVALHO (2009).

Com a caracterização físico-química da cerveja obtida na planta piloto, verificou-se que a cerveja com 25% de melado de cana apresentou uma concentração de dicetonas vicinais um pouco acima das cervejas de mercado e bem abaixo da cerveja de banana.

A cerveja de melado também apresentou elevada concentração de potássio (523,1 ± 0,22 mg/L) em relação as cervejas *lager* convencionais do mercado (200 mg/L) e de cálcio (60,7 ± 0,04 mg/L) em relação à cerveja de banana (11,04 mg/L). Além disso, apresentou baixas concentrações de magnésio e sódio (9,74 ± 0,13 e 36,6 ± 0,30 mg/L) respectivamente em relação às demais cervejas.

5.3.Determinação de açúcares

Na Tabela 27 verificam-se os açúcares na cerveja de melado de cana e observa-se que as concentrações são baixas, já que esses compostos são utilizados durante a fermentação.

Durante a fermentação, os açúcares do mosto são convertidos em compostos voláteis e etanol, assim como ésteres e álcoois superiores. Alguns compostos voláteis são reduzidos em concentração durante a maturação, que segue após a fermentação, no

entanto, uma fração de álcoois superiores, ésteres, e outros compostos carbonílicos podem permanecer, afetando o sabor do produto final (KOBAYASHI; SHIMIZU; SHIOYA, 2008).

Tabela 27 – Concentrações de açúcares em cerveja de melado.

Açúcares	Unidade	Cerveja com 25% de melado
Glicose	g/L	0,027 ± 0,00
Maltose	g/L	0,801 ± 0,03
Maltotriose	g/L	1,762 ± 0,03
Maltotetraose	g/L	1,121 ± 0,04
Maltopentaose	g/L	0,359 ± 0,01
Maltohexaose	g/L	0,584 ± 0,01
Maltoheptaose	g/L	0,765 ± 0,01
Maltooctaose	g/L	1,125 ± 0,03

5.4.Determinação de ésteres e álcoois superiores

Perfis quantitativos de ésteres e de álcoois superiores foram realizados para a cerveja de melado fresca e para a cerveja envelhecida por 9 meses a 22°C (Tabela 28). Nesta tabela também se encontra resultados referentes a uma cerveja puro malte elaborada por De Rouck (2013), a fim de comparação.

Tabela 28 – Concentrações de ésteres e álcoois superiores em cerveja de melado fresca e envelhecida (9meses/22°C) e em cerveja puro malte fresca.

Compostos	Unidade	cerveja com 25%		
		cerveja com 25% de melado fresca	de melado envelhecida (9m/22°C)	cerveja puro malte fresca*
n-propanol	mg/L	18,0 ± 7,4	28,2 ± 7,7	NA ^a
Acetato de etila	mg/L	36,5 ± 0,2	68,2 ± 0,5	14,0 ± 1,6
Isobutanol	mg/L	22,9 ± 2,0	37,9 ± 2,6	NA ^a
3-metil-1-butanol	mg/L	50,2 ± 1,7	81,6 ± 0,8	35,6 ± 5,3
2-metil-1-butanol	mg/L	20,0 ± 0,6	32,9 ± 0,9	12,0 ± 1,9
Acetato de isobutila	µg/L	1296,0 ± 0,1	255,0 ± 2,0	NA ^a
Etil butanoato	µg/L	78,0 ± 0,0	269,0 ± 15,0	NA ^a
Acetato de isoamila	µg/L	1161,4 ± 0,1	7890,0 ± 60,0	802,0 ± 127,0
Hexanoato de etila	µg/L	2,8 ± 0,0	396,0 ± 0,0	161,0 ± 13,0
Octanoato de etila	µg/L	251,6 ± 0,0	127,0 ± 3,0	240,0 ± 18,0
Feniletilacetato	µg/L	526,5 ± 0,0	1860,0 ± 130,0	242,0 ± 26,0
Decanoato de etila	µg/L	42,0 ± 0,0	2,8 ± 6,0	103,0 ± 3

^a NA: não avaliado

*Composição de ésteres e álcoois superiores de cerveja puro malte fresca, de acordo com De Rouck (2013).

Os álcoois superiores estão presentes na cerveja em quantidades muito baixas e contribuem para o seu aroma e sabor, dando-lhe um aroma alcoólico típico de bebida fermentada. A sua síntese está associada com a assimilação de compostos nitrogenados pelas leveduras, mais precisamente pelo consumo e pela produção de aminoácidos (ARAÚJO; SILVA; MINIM, 2003).

Os álcoois superiores mais importantes encontrados na cerveja são: n-propanol, iso-butanol, 2-metil-1-butanol e o 3-metil-1-butanol. Em níveis altos, os álcoois superiores afetam a qualidade da cerveja, reduzindo a qualidade da espuma e causando anormalidades sensoriais, e em casos extremos induzem dores de cabeça em pessoas suscetíveis (ARAÚJO; SILVA; MINIM, 2003).

Em relação aos álcoois superiores (n-propanol, iso-butanol, 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol), houve um aumento em sua concentração quando se comparou a cerveja fresca com a cerveja que foi envelhecida por 9 meses a 22°C.

O composto 3-metil-1-butanol foi o que esteve em maior quantidade nas cervejas fresca e envelhecida comparada com os demais álcoois superiores avaliados.

A concentração de n-propanol da cerveja de melado fresca do presente trabalho ($18,0 \pm 7,4$ mg/L) foi próxima ao valor da cerveja de banana elaborada por Carvalho (2009), que foi de 17,11 mg/L. Já as cervejas de mercado, segundo Cruz (2007), apresentaram valores de 9 mg/L.

Em relação ao iso-butanol, a cerveja de melado fresca ($22,9 \pm 2,0$ mg/L) apresentou concentrações próximas ao da cerveja de banana que foi de 18,82 mg/L (CARVALHO, 2009) e demais cervejas do estilo Pilsen do mercado, de 20,00 mg/L segundo Cruz (2007).

Já os ésteres dão à cerveja um aroma e sabor frutado e, quantitativa e qualitativamente, os ésteres mais importantes são o acetato de etila e o acetato de isoamila. A presença dos ésteres no produto é desejável em concentrações apropriadas, de modo que uma falha no processo de fermentação pode resultar em níveis inaceitáveis de ésteres no produto (ARAÚJO; SILVA; MINIM, 2003).

Para os ésteres acetato de isobutila, octanoato de etila e decanoato de etila houve uma diminuição em suas concentrações com o envelhecimento da cerveja. Os demais ésteres analisados aumentaram a sua concentração com o processo de envelhecimento.

Comparando-se a cerveja de melado fresca e a puro malte fresca, destaca-se que a primeira apresentou um teor mais elevado de hexanoato de etila, enquanto a segunda teve uma concentração maior de acetato de etila.

O éster acetato de etila foi o que se apresentou em maiores concentrações tanto na cerveja fresca ($36,5 \pm 0,2$ mg/L) como na envelhecida ($68,2 \pm 0,5$ mg/L). Esse composto também foi superior ao da cerveja de banana que estava na concentração de 15,39 mg/L (CARVALHO, 2009) e de cervejas comerciais de mercado, na concentração de 32,00 mg/L (CRUZ, 2007).

O acetato de etila é o éster que possui maior influência no aroma e sabor da cerveja, de modo que sua concentração muito alta no produto final pode distorcer o seu aroma, dando a ela um aroma forte de fruta ou uma característica forte de cerveja do tipo *ale* (ARAÚJO; SILVA; MINIM, 2003).

Os ésteres contribuem com aromas de fruta e flores e o acetato de etila representa aproximadamente um terço de todos os ésteres de cervejas. A sua concentração limiar é de 30 mg/L, mas para as cervejas do tipo *lager*, a concentração recomendada é menor de 5 mg/L (ŠMOGROVIČOVÁ; DÖMÉNY, 1999).

O hexanoato de etila da cerveja de melado aumentou cerca de 140 vezes a sua concentração com o envelhecimento. O hexanoato de etila da cerveja de melado de cana fresca ($2,8 \pm 0,0 \mu\text{g/L}$) esteve bem abaixo do valor encontrado na cerveja de banana desenvolvida por Carvalho (2009) que foi de aproximadamente de $430 \mu\text{g/L}$ e de cerveja Pilsen do mercado, segundo Cruz (2007), com $200 \mu\text{g/L}$. Porém, com o envelhecimento por 9 meses a 22°C , a cerveja aqui elaborada apresentou valor superiores aos descritos anteriormente.

Para os mesmos estudos descritos, Carvalho (2009) obteve valor de acetato de isoamila de $1200 \mu\text{g/L}$ e Cruz (2007) de $300 \mu\text{g/L}$.

O acetato de isoamila é produzido pela levedura e provoca um sabor de banana na cerveja, no entanto, durante o armazenamento, a concentração desse éster pode diminuir para níveis abaixo do seu limiar, o que resulta em uma diminuição do seu sabor frutado (VANDERHAEGEN et al., 2006). Isso não foi verificado no presente estudo, pois o acetato de isoamila aumentou sua concentração em quase 7 vezes em 9 meses de armazenamento a 22°C .

Na Tabela 29, é possível verificar os limiares e os descritores de sabor dos álcoois superiores e ésteres avaliados no presente estudo.

Tabela 29 – Seleção dos álcoois superiores e ésteres estudados com seus descritores de sabor e limiares organolépticos.

	Descritores de sabor	Limiares organolépticos(mg/L)
n-propanol	álcool	800*
Acetato de etila	ND ^a	30 (recomendado < 5 para cervejas <i>lager</i>)**
Iso-butanol	ND ^a	100-175***
3-metil-1-butanol	álcool, banana, adocicado	70*
2-metil-1-butanol	álcool, banana, solvente	65*
Acetato de isobutila	fruta	0-5***
Butanoato de etila	fruta	0,001****
Acetato de isoamila	banana, maçã, solvente, éster	1,2*
Hexanoato de etila	maçã	0,005**
Octanoato de etila	maçã	0,5**
Feniletilacetato	rosas, mel, maçã, adocicado	3,8*
Decanoato de etila	maçã	10,5**

*(KOBAYASHI; SHIMIZU; SHIOYA, 2008); **(*ŠMOGROVIČOVÁ; DÖMÉNY, 1999), ***(ENGAN, 1972), ****(SCHIEBERLE, 1991). ND: ^aNada descrito.

5.5.Determinação de aldeídos

Perfis quantitativos de aldeídos também foram realizados para as cervejas de melado fresca e envelhecida por 9 meses a 22°C (Tabela 30). Nesta tabela também se encontra resultados referentes a uma cerveja puro malte fresca, elaborada por De Rouck (2013), a fim de comparação.

Tabela 30 – Concentrações de aldeídos em cerveja de melado fresca e envelhecida (9meses/22°C) e em cerveja puro malte fresca.

Aldeídos	Unidade	cerveja com 25%		
		cerveja com 25%	de melado	cerveja puro
		de melado	envelhecida	malte
		fresca	(9m/22°C)	fresca*
2-Metil propanal	µg/L	10,4 ± 0,4	29,7 ± 1,4	7,14 ± 3,01
2-Metil butanal	µg/L	2,3 ± 0,1	14,8 ± 0,6	3,35 ± 1,82
3-Metil butanal	µg/L	6,6 ± 0,5	32,6 ± 1,0	12,1 ± 5,26
Hexanal	µg/L	0,2 ± 0,0	1,4 ± 0,2	0,71 ± 0,19
Furfural	µg/L	11,8 ± 3,2	281,2 ± 32,8	6,59 ± 5,30
Metional	µg/L	4,1 ± 0,1	52,3 ± 9,1	5,26 ± 1,56
Benzaldeído	µg/L	0,7 ± 0,1	13,8 ± 0,6	1,78 ± 1,40
Fenilacetaldéido	µg/L	21,6 ± 1,9	132,0 ± 2,2	7,51 ± 2,69
t-2-Nonenal	µg/L	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01

*Composição de aldeídos em cerveja puro malte fresca, de acordo com De Rouck (2013).

Comparando-se a cerveja de melado fresca e a cerveja puro malte, também fresca, nota-se que não há muita diferença entre os teores de aldeídos entre elas, comprovando que o uso desse adjunto não aumentou esses compostos indesejáveis na cerveja.

Os aldeídos contribuem de forma indesejada no sabor das cervejas e, embora esta contribuição seja na maior parte das vezes imperceptível em bebidas frescas, às reações de formação desses compostos podem ocorrer durante o armazenamento, resultando na formação de uma gama de compostos carbonílicos e, conseqüentemente, causar a deterioração do sabor (VANDERHAEGEN et al., 2006).

Cervejas frescas geralmente contêm baixas concentrações de aldeídos, abaixo dos seus respectivos limiares de sabor. O aumento de suas concentrações coincide com o aparecimento de “sabores de envelhecimento” (JASKULA-GOIRIS et al., 2011).

Na cerveja com melado de cana, todos os aldeídos avaliados tiveram um aumento em suas concentrações após 9 meses de envelhecimento, exceto o trans-2-Nonenal que se manteve constante. Os compostos furfural e o benzaldeído foram os que mais aumentaram após os 9 meses de envelhecimento.

O aumento do furfural, não necessariamente significa um “*off-flavor*”, mas um indicador de deterioração de sabor (MADIGAN; PEREZ; CLEMENTS, 1998).

O aldeído trans-2-nonenal tem sido citado como o composto mais importante de cervejas *lager* envelhecidas, porque sempre foi verificado que a sua concentração aumentava repetidamente durante o envelhecimento em níveis acima do limiar de sabor (cerca de 0,03 µg/L) de acordo com Saison et al. (2009), gerando um sabor de “papelão” (BAERT et al., 2012).

Neste estudo, níveis de $0,03 \pm 0,00$ µg/L para cerveja fresca e $0,02 \pm 0,01$ µg/L para a cerveja envelhecida foram encontrados na cerveja de melado de cana. Ao longo dos anos, tornou-se claro que o trans-2-nonenal é apenas um dos compostos que fazem parte de um conjunto de outros compostos que aparecem ao longo do envelhecimento (BAERT et al., 2012). Veja na Tabela 31 os aldeídos avaliados neste estudo e seus descritores de sabor.

Tabela 31 – Seleção dos aldeídos estudados e seus descritores de sabor (BAERT et al., 2012).

Aldeídos	Descritores de sabor
2-Metil propanal	verniz, frutado
2-Metil butanal	amêndoa, maçã, maltado
3-Metil butanal	maltado, chocolate, cereja, amêndoa
Hexanal	amargo, gosto de vinho
Furfural	caramelo, pão, carne cozida
Metional	batatas cozidas, mosto
Benzaldeído	amêndoa, cereja, pedra
Fenilacetaldéido	flores, rosas
(E)-2-nonenal	Papel, pepino

Sabe-se que os aldeídos desempenham um papel importante na deterioração do sabor e do aroma das cervejas durante o armazenamento, e o desenvolvimento destes sabores típicos do envelhecimento tem sido associados à oxidação de álcoois superiores, a

oxidação de ácidos derivados do lúpulo, degradação de Strecker, oxidação de ácidos graxos insaturados e condensações aldólica (VESELY et al., 2003).

Vários aspectos da qualidade da cerveja estão sujeitos a mudanças durante o seu armazenamento e a alteração no sabor é de grande preocupação, pois é considerado o principal parâmetro de qualidade. Devido ao crescimento da exportação e da globalização do mercado, esta preocupação foi destacada e tem crescido a necessidade de controlar a sua estabilidade. Apesar de 30-40 anos de pesquisa nessa área, ainda é um desafio superar esse problema (SAISON et al., 2008).

As pessoas não necessariamente desgostam do sabor de uma cerveja envelhecida, mas quando o consumidor aprecia uma determinada marca de cerveja, ele tem expectativas de reconhecer o sabor que eles geralmente bebem, já que cada marca deve ter o sabor constante. No entanto, o sabor normalmente esperado é o fresco e na cerveja envelhecida, isto tende a mudar. Dessa forma, essa é a razão da qual o envelhecimento é indesejável para as cervejas (VANDERHAEGEN et al., 2006).

5.6.Determinação de aminoácidos

O perfil detalhado de aminoácidos é apresentado para a cerveja com melado de cana na Figura 39.

Figura 39 – Perfil de aminoácidos em cervejas contendo 25% de melado de cana.

His: histidina; Asn: asparagina; Ser: serina; Gln: glutamina; Arg: arginina; Gly: glicina; Asp: ácido aspartico; Glu: ácido glutâmico; Thr: treonina; Ala: alanina; Pro: prolina; Cys: cistina + cisteína; Lys: lisina; Tyr: tirosina; Met: metionina; Val: valina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Phe: fenilalanina; Trp: triptofano.

Fonte: Arquivo pessoal.

A determinação de aminoácidos livres tem um papel importante na avaliação da qualidade nutricional de alimentos e bebidas (CASELLA; CONTURSI, 2003), porém, poucos grupos já discutiram sobre aminoácidos livres em cervejas, e nenhum estudo fez uma comparação global de várias marcas de cervejas (KABELOVÁ et al., 2008).

No presente estudo, verificam-se teores mais elevados de prolina, valina, alanina e tirosina, respectivamente.

Segundo Perpète et al. (2005), concentrações de prolina aumentam durante a germinação de cevada, atingindo um nível máximo após 8 dias. Além disso, a prolina é utilizada pela levedura em pequenas quantidades em mostos em condições anaeróbicas e é lentamente absorvida sob condições aeróbicas. Estes podem ser um dos motivos de se encontrar maiores concentrações de prolina na cerveja de melado de cana.

Os recentes progressos de determinações de aminoácidos podem ser atribuídos às vantagens tecnológicas da cromatografia líquida e dos detectores de análise. A separação destas moléculas e seus derivados são facilmente obtidos utilizando mistura de fase

estacionária reversa e trocadores de íons. A determinação de aminoácidos nem sempre é simples, porque estes compostos não têm fortes grupos cromóforos ou fluoróforos naturais para detecção fotométrica ou fluorométrica, portanto, a detecção requer algum procedimento de derivatização pré ou pós-coluna, a fim de introduzir fortes grupos cromóforos (KABELOVÁ et al., 2008).

Vários procedimentos de derivatização utilizam vários tipos de moléculas, mas o método de pré-coluna de derivatização utilizando o carbamato-6-aminoquinolil-N-hidroxi-succinimidilo (AQC) e detecção fluorescente é um dos métodos mais sensíveis e seletivos para determinação de aminoácidos livres (CIZKOVA et al., 2005). E foi exatamente esse procedimento utilizado para a detecção dos perfis de aminoácidos na cerveja em questão.

5.7.Determinação de ácidos orgânicos

Na Tabela 32 verificam-se os teores de ácidos orgânicos presentes na cerveja de melado de cana.

Tabela 32 – Concentrações de ácidos orgânicos em cerveja de melado de cana.

Ácidos orgânicos	Unidade	Cerveja com 25% de melado
Ácido oxálico	g/L	0,31 ± 0,01
Ácido tartárico	g/L	0,20 ± 0,00
Ácido fórmico	g/L	0,57 ± 0,00
Ácido málico	g/L	0,09 ± 0,00
Ácido láctico	g/L	0,41 ± 0,10
Ácido acético	g/L	ND < 0,007 ^a
Ácido cítrico	g/L	ND < 0,006 ^a
Ácido succínico	g/L	1,52 ± 0,02
Ácido propiônico	g/L	ND < 0,01 ^a
Ácido fumárico	g/L	ND < 0,0001 ^a

^a ND: não detectado.

Os ácidos orgânicos têm papéis importantes em bebidas porque eles afetam as propriedades organolépticas (sabor, aroma e cor), além da estabilidade, nutrição, aceitabilidade e manutenção da qualidade (SANTALAD et al., 2007).

Um grande número de ácidos orgânicos está presentes na cerveja, cuja concentração depende das matérias primas utilizadas, procedimentos durante a mosturação e das condições de fermentação e do tipo de levedura. Uma ampla variedade de ácidos orgânicos é produzida durante a fermentação, alguns dos quais contribuem para o sabor (CORTACERO-RAMÍREZ et al., 2005).

Os ácidos orgânicos afetam a acidez e o pH da cerveja, além do sabor (acidez, amargor) e tem efeitos fisiológicos positivos (diurético) (MONTANARI et al., 1999).

Sensorialmente, a função mais importante dos ácidos orgânicos na cerveja é aumentar a acidez do produto para um nível agradável ao paladar humano. A concentração de ácido acético na cerveja, por exemplo, varia de 57 a 145 mg/L (ARAÚJO; SILVA; MINIM, 2003). Na cerveja de melado, não houve presença de ácido acético, nem dos ácidos cítrico, propiônico e fumárico.

5.8. Análise sensorial

Os cento e doze consumidores recrutados para o teste de aceitação declararam a frequência de consumo da bebida de pelo menos uma vez por mês. Dessa forma, dentre os consumidores selecionados, 53% eram do sexo masculino e 47% do sexo feminino, com a maioria constituída por pessoas com o ensino superior completo (67%), idade entre 18 e 29 anos (53%) e a grande maioria disse consumir a cerveja 2 ou mais vezes por semana (41%) (Figura 40).

Figura 40 – Caracterização dos consumidores em relação ao gênero, à escolaridade, à faixa etária e ao consumo da bebida.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.8.1. Análise da aceitação dos atributos cor e aparência

A Tabela 33 mostra as médias dos escores hedônicos para o atributo COR da cerveja para os três grupos (segmentados quanto às suas preferências e rejeições) e a diferença estatística entre as bebidas avaliadas. Também é possível visualizar as médias para os diferentes grupos na Figura 41.

Tabela 33 – Escores hedônicos médios para os três grupos de aceitação quanto ao atributo cor da cerveja.

Cervejas	Grupo 1 (20%)		Grupo 2 (32%)		Grupo 3 (48%)	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
	Aceitação	Padrão	Aceitação	Padrão	Aceitação	Padrão
25% Melado	5,0 ^b	1,0	7,7 ^a	1,1	7,9 ^a	0,8
Marca 1	7,3 ^a	1,6	5,2 ^c	1,4	7,8 ^a	0,8
Marca 2	7,5 ^a	0,9	5,8 ^b	1,3	7,9 ^a	0,7

* médias seguidas de mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si a $p \leq 0,05$.

25% melado: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; marca 1 e 2: marcas comerciais do mercado.

Figura 41 – Perfil dos escores hedônicos para os três grupos de aceitação quanto à cor das cervejas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto a aceitação do atributo COR, 48% dos consumidores (Grupo 3) gostaram igualmente da cor das três cervejas analisadas e atribuíram notas altas. Do grupo 2, 32% dos consumidores preferiram significativamente a cor da cerveja com 25% de melado em relação às demais bebidas; enquanto que 20% preferiram a cor tanto da marca 1 quanto da marca 2 quando comparada à cerveja com 25% de melado.

A Tabela 34 mostra as médias dos escores hedônicos para o atributo APARÊNCIA da cerveja para os três grupos (segmentados quanto às suas aceitações e rejeições) e a

diferença estatística entre as bebidas avaliadas. Também é possível visualizar as médias para os diferentes grupos na Figura 42.

Tabela 34 – Escores hedônicos médios para os três grupos de aceitação quanto ao atributo aparência da cerveja.

Cervejas	Grupo 1 (24%)		Grupo 2 (41%)		Grupo 3 (35%)	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
	Aceitação	Padrão	Aceitação	Padrão	Aceitação	Padrão
25% Melado	5,3 ^b	1,1	8,0 ^a	0,7	7,7 ^a	1,2
Marca 1	7,7 ^a	1,2	7,8 ^a	0,7	5,0 ^c	1,2
Marca 2	7,1 ^a	1,6	7,7 ^a	0,9	6,1 ^b	1,4

* médias seguidas de mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si a $p \leq 0,05$.

25% melado: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; marca 1 e 2: marcas comerciais do mercado.

Figura 42 – Perfil dos escores hedônicos para os três grupos de aceitação quanto à aparência das cervejas.

Fonte: Arquivo pessoal.

A aceitação do atributo APARÊNCIA apresentou o mesmo perfil de aceitação da cor das cervejas. O grupo maior (41%) gostou igualmente da aparência das três cervejas analisadas e atribuíram notas altas. No grupo 3, 35% dos consumidores preferiram significativamente a cerveja com 25% de melado em relação às demais bebidas; enquanto que 24% preferiram a aparência tanto da marca 1 quanto da marca 2 quando comparada à

cerveja com 25% de melado. O efeito de halo é uma tendência dos consumidores já esperada para este caso dos atributos APARÊNCIA e COR, ou seja, a tendência a atribuir classificações semelhantes a esses atributos (DUTCOSKY, 2013).

A Figura 43 apresenta os histogramas e a classificação dos escores hedônicos obtidos para a COR e para a APARÊNCIA das cervejas em análise.

Figura 43 – Histograma e classificação dos escores hedônicos obtidos para a cor e aparência das cervejas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto à classificação dos escores hedônicos para a COR, a marca 2 e a com 25% de melado foram as que obtiveram maior proporção de notas na região de aceitação (valores ≥ 7), 76% e 75%, respectivamente. A cerveja da marca 1 apresentou o pior desempenho em relação à cor, com a maior proporção na região de rejeição (valores ≤ 4) e na região da indiferença (valores entre 5 e 6), de 11% e de 26%, respectivamente.

A classificação dos escores hedônicos para a APARÊNCIA foi muito similar, ou seja, a marca 2 e a cerveja com 25% de melado foram as que obtiveram maior proporção de notas na região de aceitação (valores ≥ 7), 68% e 71%, respectivamente. A cerveja da marca 1 apresentou o pior desempenho em relação à aparência, com maior proporção na região de rejeição (valores ≤ 4) e na região da indiferença (valores entre 5 e 6), de 8% e de 33%, respectivamente.

5.8.2. Análise da aceitação do atributo odor

A Tabela 35 mostra as médias dos escores hedônicos para o atributo ODOR das cervejas para os três grupos (segmentados quanto às suas aceitações e rejeições) e a diferença estatística entre as bebidas avaliadas. Também é possível visualizar as médias para os diferentes grupos na Figura 44.

Tabela 35 – Escores hedônicos médios para os três grupos de aceitação quanto ao atributo odor da cerveja.

Cervejas	Grupo 1 (14%)		Grupo 2 (52%)		Grupo 3 (34%)	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
	Aceitação	Padrão	Aceitação	Padrão	Aceitação	Padrão
25% Melado	5,9 ^a	1,5	8,2 ^a	0,7	6,7 ^b	1,62
Marca 1	4,6 ^a	1,31	6,0 ^b	1,13	8,0 ^a	0,75
Marca 2	5,5 ^a	1,55	6,2 ^b	1,5	7,6 ^a	1,38

* médias seguidas de mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si a $p \leq 0,05$.

25% melado: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; marca 1 e 2: marcas comerciais do mercado.

Figura 44 – Perfil dos escores hedônicos para os três grupos de aceitação quanto ao odor das cervejas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto à aceitação do atributo ODOR, o grupo maior (52%) preferiu significativamente o odor da cerveja com 25% de melado em relação às demais bebidas ($p \leq 0,05$). Outro grupo (34%) preferiu significativamente o odor das marcas 1 e 2 quando comparado ao da cerveja com 25% de melado ($p \leq 0,05$). Um pequeno grupo, equivalente a 14% da população, parece não gostar do odor de nenhuma destas cervejas.

A Figura 45 apresenta o histograma e a classificação dos escores hedônicos obtidos para o odor das cervejas em análise.

Figura 45 – Histograma e classificação dos escores hedônicos para o odor das cervejas.

Fonte: Arquivo pessoal.

A cerveja com 25% de melado obteve a maior proporção de aceitação (valores ≥ 7) em relação ao odor, com 78%, enquanto as marcas 1 e 2 obtiveram maior proporção de rejeição e indiferença, somando 46% e 47%, respectivamente. No histograma observa-se a maior proporção de nota máxima (9) para o odor da cerveja com 25% de melado.

5.8.3. Análise da aceitação do atributo sabor

A Tabela 36 mostra as médias dos escores hedônicos para o atributo SABOR das cervejas para os três grupos (segmentados quanto às suas aceitações e rejeições) e a diferença estatística entre as bebidas avaliadas. O perfil das médias para os diferentes grupos é visualizado na Figura 46.

Tabela 36 – Escores hedônicos médios para os três grupos de aceitação quanto ao atributo sabor da cerveja.

Cervejas	Grupo 1 (28%)		Grupo 2 (27%)		Grupo 3 (45%)	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
	Aceitação	Padrão	Aceitação	Padrão	Aceitação	Padrão
25% Melado	4,7 ^b	1,2	7,6 ^a	0,9	7,9 ^a	0,9
Marca 1	7,0 ^a	1,4	4,3 ^c	1,5	7,5 ^a	0,9
Marca 2	6,3 ^a	1,9	5,7 ^b	1,8	7,6 ^a	0,9

* médias seguidas de mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si a $p \leq 0,05$.

25% melado: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; marca 1 e 2: marcas comerciais do mercado.

Figura 46 – Perfil dos escores hedônicos para os três grupos de aceitação quanto ao sabor das cervejas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto a aceitação do atributo SABOR, o grupo 3 é o que tem maior porcentagem da população (45%) e foi o grupo que gostou igualmente de todas as cervejas, atribuindo notas altas. É possível visualizar o perfil deste grupo, que não difere na preferência do sabor, como também dos demais grupos na Figura 50. O grupo 2 (27%) preferiu significativamente a cerveja elaborada com 25% de melado em relação às outras duas bebidas e a marca 1 foi significativamente rejeitada em relação às outras duas. O grupo 1 (28%) preferiu o sabor das marcas 1 e 2 quando comparado ao da cerveja com 25% de melado ($p \leq 0,05$).

A Figura 47 apresenta o histograma e a classificação dos escores hedônicos obtidos para o sabor das cervejas em análise.

Figura 47 – Histograma e classificação dos escores hedônicos para o sabor das cervejas.

Fonte: Arquivo pessoal.

A cerveja com 25% de melado obteve a maior proporção de aceitação (valores ≥ 7) em relação ao sabor, com 66%. A marca 1 obteve maior proporção de rejeição (14%) e também de indiferença (30%).

5.8.4. Análise da impressão global das cervejas

A Tabela 37 mostra as médias dos escores hedônicos para a IMPRESSÃO GLOBAL das cervejas para os três grupos (segmentados quanto às suas aceitações e rejeições) e a diferença estatística entre as bebidas avaliadas. O perfil das médias para os diferentes grupos é visualizado na Figura 50.

Tabela 37 – Escores hedônicos médios para os três grupos de aceitação quanto à impressão global das cervejas.

Cervejas	Grupo 1 (20%)		Grupo 2 (50%)		Grupo 3 (30%)	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
	Aceitação	Padrão	Aceitação	Padrão	Aceitação	Padrão
25% Melado	5,0 ^b	1,3	7,9 ^a	0,7	7,7 ^a	0,7
Marca 1	7,0 ^a	1,7	7,6 ^a	0,8	5,2 ^b	1,6
Marca 2	6,8 ^a	1,2	7,7 ^a	0,9	5,8 ^b	1,7

* médias seguidas de mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si a $p \leq 0,05$.

25% melado: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; marca 1 e 2: marcas comerciais do mercado.

Quanto a aceitação GLOBAL, o grupo 2 é o que tem maior porcentagem da população (50%) e foi o grupo que gostou igualmente de todas as cervejas, atribuindo notas altas. O grupo 3 (30%) preferiu significativamente a cerveja elaborada com 25% de melado em relação às outras duas marcas de cerveja ($p \leq 0,05$). O grupo 1 (20%) preferiu o sabor das marcas 1 e 2 quando comparado ao da cerveja com 25% de melado ($p \leq 0,05$).

A Figura 48 apresenta o histograma e a classificação dos escores hedônicos obtidos para a impressão global das cervejas em análise.

Figura 48 – Histograma e classificação dos escores hedônicos para a impressão global das cervejas.

Fonte: Arquivo pessoal.

A cerveja com 25% de melado obteve a maior proporção de aceitação global, com 79% dos valores ≥ 7 . A marca 1 obteve maior proporção de rejeição (13%) e também de indiferença (23%). No histograma observa-se que a cerveja com 25% de melado recebeu 43% do escore 8, equivalente ao conceito “gostei muito”.

As Figuras 49 e 50 mostram a ACP e o perfil de preferência dos três grupos de consumidores. As componentes CP1 e CP2 explicam 79,11% da variação total, onde visualiza-se o grupo 2 (50%) mais próximo das três cervejas analisadas porque gostaram igualmente de todas. O grupo 3 (30%) preferiu significativamente a cerveja elaborada com 25% de melado e o grupo 1 (20%) mais distante da cerveja com 25% de melado.

Figura 49 – ACP da impressão global das cervejas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 50 – Perfil dos escores hedônicos para os três grupos de preferência quanto à impressão global das cervejas.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.8.5. Análise Geral

Na Tabela 38 estão compilados os resultados de aceitação para todos os atributos avaliados e observamos que os atributos cor, aparência, sabor e impressão global apresentaram perfil muito semelhante na segmentação das preferências e rejeições, com exceção do atributo odor, o qual apresentou um perfil diferente.

Para cor, aparência, sabor e impressão global o grupo maior gostou igualmente de todas as cervejas, as quais apresentaram médias altas. O grupo intermediário preferiu a cerveja com 25% de melado e o grupo menor rejeitou esta mesma cerveja. De forma geral, a cerveja com 25% de melado foi muito bem aceita nestes atributos, sendo preferida por uma faixa de 72 a 80% da população.

Para o odor, mais de 50% da população preferiu significativamente a cerveja com 25% de melado, enquanto que o grupo intermediário rejeitou esta mesma cerveja e um grupo relativamente pequeno (14%) atribuiu valores mais baixos para o odor das três cervejas analisadas.

Tabela 38 – Análise Geral dos grupos de preferência por atributo.

Cervejas	Cor			Aparência			Odor			Sabor			Global		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
	20%	32%	48%	24%	35%	41%	14%	34%	52%	28%	27%	45%	20%	50%	30%
25%M	b	a	a	b	a	a	a	b	a	b	a	a	b	a	a
Marca 1	a	c	a	a	c	a	a	a	b	a	c	a	a	a	b
Marca 2	a	b	a	a	b	a	a	a	b	a	b	a	a	a	b

5.8.6. Análise da relação das preferências com as características do perfil do consumidor

As seguintes características dos consumidores foram avaliadas quanto ao entendimento dos grupos de preferência da impressão global das cervejas: gênero, escolaridade, faixa etária, frequência de consumo da bebida e a cerveja predileta declarada pelo consumidor.

Não foi encontrada correspondência significativa entre os grupos de preferência e o grau de escolaridade e a frequência de consumo da bebida. Para gênero, faixa etária e a

cerveja predileta foram encontradas correlações, demonstradas nos mapas de percepção das Figuras 51, 52 e 53.

Observando-se que o grupo 2, que gostou e aprovou as três cervejas igualmente, são principalmente mulheres, entre 18 e 25 anos e que declararam como suas cervejas prediletas as marcas Brahma, Skol e outras.

O grupo 3, que preferiu significativamente a cerveja com 25% de melado, caracteriza a preferência dos homens, entre 26 e 35 anos de idade e que preferem as cervejas especiais (cervejas de diferentes estilos, tais como de trigo, *red ale*, *american pale ale*, *indian pale ale*, *belgian blond ale*, *belgian strong ale*, stout e bock) ou a Heineken.

O grupo 1, que não gostou da cerveja com 25% de melado, é composto principalmente por mulheres, entre 36 e 45 anos e que declaram não ter preferência específica por uma marca comercial de cerveja.

Figura 51 – Mapa de percepção entre grupos de preferência e gênero.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 52 – Mapa de percepção entre grupos de preferência e faixa etária.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 53 – Mapa de percepção entre grupos de preferência e cerveja predileta.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.8.7. Teste de atitude de compra

A Figura 54 ilustra a atitude de compra dos consumidores em relação a cada cerveja produzida.

Verifica-se que para a opção “certamente compraria”, a maior porcentagem (42% dos consumidores) foi maior para a cerveja contendo 25% de melado. Já para a opção “provavelmente compraria” a cerveja da marca 2 foi a que teve maior valor, seguida da marca 1 e a com 25% de melado, respectivamente.

No entanto, a cerveja com 25% de melado de cana obteve os menores valores para as opções “tem dúvidas”, “provavelmente não comprariam” e “certamente não comprariam”.

Figura 54 – Representação gráfica dos resultados do teste de aceitação em relação à atitude de compra.

25% melado: cerveja elaborada com 25% de melado de cana; marca 1 e 2: marcas comerciais do mercado.
Fonte: Arquivo pessoal.

6. CONCLUSÕES

A cerveja com 25% de melado de cana a 16°P apresentou durante a fermentação uma produtividade volumétrica máxima de 0,50 g/L.h, no tempo de 56 h, com rendimento aparente em etanol de 0,30 g/g.

Com a caracterização físico-química da cerveja diluída para aproximadamente 12°P, verificou-se que a cerveja com 25% de melado apresentou teor alcóolico de $5,58 \pm 0,04$ % (v/v), elevado grau aparente de fermentação ($88,12 \pm 0,19$ %) e cor $12,88 \pm 0,92$ EBC. A cerveja também apresentou uma elevada concentração de potássio ($523,1 \pm 0,22$ mg/L) comparada com cervejas *lager* convencionais do mercado (200 mg/L).

Com o envelhecimento das cervejas por 9 meses a 22°C, houve um aumento na concentração de álcoois superiores e aldeídos. A maioria dos ésteres avaliados também aumentou sua concentração com o envelhecimento, exceto para o acetato de isobutila, octanoato de etila e decanoato de etila.

Após a realização da análise sensorial da cerveja elaborada juntamente com duas cervejas comerciais claras do tipo Pilsen, do mercado brasileiro, observou-se que a cerveja com 25% de melado foi estatisticamente mais aceita em relação às demais amostras.

Em relação ao teste de atitude de compra, 42% dos julgadores optaram pela opção “certamente compraria” a cerveja de melado de cana, ou seja, demonstrando que a bebida produzida é sensorialmente viável, atingindo principiamente homens na faixa etária de 26 e 35 anos.

REFERÊNCIAS

AMERICAN SOCIETY BREWING CHEMISTS. Foan Collapse Rate. In: METHODS of analysis of the american society of brewing chemists. St. Paulo, Minnesota - U.S.A, 1976. p. 1-3.

ARAKI, S., KIMURA, T., SHIMIZU, C., FURUSHO, S., TAKASHIO, M. SHINOTSUKA, K. Estimation of antioxidative activity and its relationship to beer flavor stability. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 57, p. 34-37, 1999.

ARAÚJO, F. B.; SILVA, P. H. A.; MINIM, V. P. R. Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 121-128, 2003.

ASBC - **Methods of Analysis of the American Society of Brewing Chemists**. 8th rev. ed. Minnesota: The Technical Committee and the Editorial Committee of the ASBC, 1996.

BAERT, J. J.; DE CLIPPELEER, J.; HUGHES, P. S.; DE COOMAN, L.; AERTS, G. On the origin of free and bound staling aldehydes in beer. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 60, p. 11449-11472, 2012.

BAMFORTH C. W. **Brewing**. Cambridge, England: Woodhead, , 2006, p. 427-460.

BORZANI, W. Cinética de processos fermentativos. **Revista Brasileira de Engenharia**, v. 3, n. 2, p. 61, 1986.

BRODERICK, H.M. (Ed.), **The practical brewer**: a manual for the brewing industry. 2nd ed. Madison, WI. Master Brewers Association of the Americas, 1977.

BUI, L. V.; COOPER, C. Reverse-phase liquid chromatographic determination of benzoic and sorbic acids in foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 70, n. 5, p. 892-896, 1987.

CASELLA, I.G.; CONTURSI, M. Isocratic ion chromatographic determination of underivatized amino acids by electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 478, p. 179-189, 2003.

CARVALHO, G. B. M. **Obtenção de cerveja usando banana como adjunto e aromatizante**. 2009. 163f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial - Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (USP), Lorena - SP, 2009.

CIZKOVA, H.; HOFTA, P.; KOLOUCHOVA, I.; DOSTALEK, P. The importance of amino acids in brewing industry and new methods of their determination. **Kvasny Prumysl**, v. 51, p. 47-51, 2005.

CORTACERO-RAMÍREZ, S.; SEGURA-CARRETERO, A.; CASTRO, M. H.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Determination of low-molecular-mass organic acids in any type of beer samples by coelectroosmotic capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1064, p. 115-119, 2005.

CRUZ, J. M. M. Cerveja. In: FONSECA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. **Reactores biológicos**. Lisboa/Porto: Lidel, 2007. p. 277-305.

DE ROUCK, G. **System changes in wort production for the improvement of the flavor stability of lager beer**. 2013. 135f. Thesis (Doctor in Bioscience Engineering) – Faculty of Bioscience Engineering, KU Leuven, Belgium, 2013.

DRAGONE, G. **Estudo cinético do processo fermentativo de produção de cervejas em mostos concentrados**. 2002. 111f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2002.

ENGAN, S. Organoleptic threshold values of some alcohols and esters in beer. **Journal of The Institute of Brewing**, v. 78, p. 33-36, 1972.

ENGELMANN, J.; MIEDANER, H. Métodos de producción de cerveza: matérias primas y aditivos de uso corriente. **Brewing and Beverage Industry Español**, n. 3, p. 10-16, 2005.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **Analytica-EBC**. Fachverlag Hans Carl. Nuremberg. EBC Analysis Committee. 2010.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**, Curitiba: Editora Champagat, 2013. 531p.

HAIR, J. R. et al. **Análise multivariada de dados**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2005.

HORWITZ, W.; LATIMER JR., GEORGE W. (Ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2005. Current Through Revision 3, 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos/coordenadores**. Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglia. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005.

JASKULA-GOIRIS, B.; DE CAUSMAECKER, B.; DE ROUCK, G.; DE COOMAN, L.; AERTS, G. Detailed multivariate modeling of beer staling in commercial pale lagers. **Brewing Science**, v. 64, p. 119-139, 2011.

KABELOVÁ, I.; DVOŘÁKOVÁ, M.; ČÍŽKOVÁ, H.; DOSTÁLEK, P.; MELZACH, K. Determination of free amino acids in beers: a comparison of Czech and foreign brands. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 736-741, 2008.

KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, n. 4, p. 317-323, 2008.

KORDIŠ-KRAPEŽ, M.; ABRAM, V.; KRAŽ, M.; FERJANCIC, S. Determination of organic acids in white wines by RP-HPLC. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 93-99, 2001.

MADIGAN, D.; PEREZ, A.; CLEMENTS, M. Furanic aldehyde analysis by HPLC as a method to determine heat-induced flavor damage to beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 56, n. 4, p. 146-151, 1998.

MALFLIET, S.; VAN OPSTAELE, F.; DE CLIPPELEER, J.; SYRYN, E.; GOIRIS, K.; DE COOMAN, L.; AERTS, G. Flavor instability of pale lager beers: determination of analytical markers in relation to sensory ageing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, p. 180-192, 2008.

MATTOS, R. C.F. **Efeito das variáveis de transporte e estocagem sobre a estabilidade sensorial de cervejas tipo Pilsen**. 2007. 92f. (Tese de doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas – SP, 2007.

MEILGAARD, M. Effects on flavor of innovations in brewery equipment and processing: a review. **Effects on Flavor of Innovations in Brewery Equipment and Processing**, v. 7, n. 5, p. 271-286, 2001.

MONTANARI, L.; PERRETTI, G.; NATELLA, F.; ALESSIA GUIDI, A.; FANTOZZI, P. Organic and phenolic acids in beer. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 32, p. 535-539, 1999.

MOSER, A. Bioprocess technology. Kinetics and reactors. New York: Springer-Verlag, 1988. 451p.

PERPETE, P.; SANTOS, G.; BODART, E.; COLLIN, S. Uptake of amino acids during beer production: the concept of a critical time value. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 63, p. 23-27, 2005.

SAISON, D.; DE SCHUTTER, D. P.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. R. Optimisation of a complete method for the analysis of volatiles involved in the flavor stability of beer by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, p. 342-349, 2008.

SAISON, D.; DE SCHUTTER, D. P.; UYTENHOVE, B.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. R. Contribution of staling compounds to the aged flavor of lager beer by studying their flavor thresholds. **Food Chemistry**, 114, 1206-1215, 2009.

SANTALAD, A.; TEERAPORNCHASIT, P.; BURAKHAM, R.; SRIJARANAI, S. Capillary zone electrophoresis of organic acids in beverages. **LWT**, v. 40, p. 1741-1746, 2007.

SCHIEBERLE, P. Primary odorants of pale lager beer. Differences to other beers and changes during storage. **Z. Lebensm Unters Forsch**, v. 193, p. 558-565, 1991.

SENAI. **Conheça a cerveja**. Rio de Janeiro: Setor de Documentação Bibliográfica do CENATEC de Produtos Alimentares do SENAI – DR/RJ, 1997.

SILVA, G. A.; AUGUSTO, F.; POPPI, R. J. Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS-SPME-GC. **Food Chemistry**, v. 111, p. 1057-1063, 2008.

SILVA, P. H. A.; FARIA, F. C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 902-906, 2008.

ŠMOGROVIČOVÁ, D.; DÖMÉNY, Z. Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilised yeasts. **Process Biochemistry**, v.34, p.785-794, 1999.

STEWART, G. G. A Brewer's delight. **Chemistry and Industry**, p. 706-709, 2000.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. The chemistry of beer aging: a critical review. **Food Chemistry**, v. 95, p. 357-381, 2006.

VESELY, P.; LUSK, L.; BASAROVA, G.; SEABROOKS, J.; RYDER, D. Analysis of aldehydes in beer using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 6941-6944, 2003.

CAPÍTULO 5 – USO DE MELADO DE CANA COMO ADJUNTO NA PRODUÇÃO DE CERVEJAS *LAGER* E ALE

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, cervejas do tipo Pilsen fazem parte de 98% do mercado consumidor com apenas uma limitada escolha por outros tipos de cervejas (SILVA; FARIA, 2008). Enquanto a apreciação de cervejas do tipo Pilsen pelos consumidores muitas vezes é subjetiva, tendo em vista as semelhanças sensoriais entre elas, as preferências dos consumidores por cervejas especiais abrangem uma gama muito mais ampla, por causa dos aromas e sabores amplamente variáveis que, em geral, levam a pessoa a diferentes experiências sensoriais (BAMFORTH (Ed.), 2006).

Os adjuntos na produção de cerveja podem ser definidos como qualquer fonte de carboidratos diferente do malte e que contribui com açúcares fermentescíveis para o mosto (STEWART, 2000). O uso de adjuntos na fabricação de cerveja é permitido pela legislação de diversos países e há uma variedade de matérias primas permitidas (ENGLMANN; MIEDANER, 2005).

Os adjuntos são usados principalmente para fornecer um extrato de baixo custo, sendo uma fonte barata de carboidratos, em comparação com o malte de cevada, e também de ser altamente disponível para as leveduras (BOTELHO, 2009).

Cervejas com adjuntos em sua composição são mais leves e mais adequadas às necessidades do mercado consumidor brasileiro. Cada empresa define a proporção de malte e adjuntos em seus produtos, seguindo uma tendência mundial de utilização de adjuntos na produção de cerveja. No entanto, o uso abusivo de adjuntos pode resultar em uma cerveja pobre de corpo e com baixa qualidade de espuma (SLEIMAN, 2006).

A partir da prensagem da cana de açúcar, obtém-se o caldo de cana ou garapa, que é um alimento altamente energético por possuir em sua composição ferro, cálcio, potássio, sódio, magnésio, vitaminas C e do complexo B e uma grande quantidade de carboidratos (CARVALHO; MAGALHÃES, 2007). Segundo Stupiello (1987), o caldo de cana é constituído basicamente por água (80%) e sólidos totais dissolvidos (20%), destacando-se entre estes, os açúcares tais como a sacarose (17%), glicose (0,4%) e frutose (0,2%) e os compostos orgânicos constituídos por substâncias nitrogenadas, gorduras, ceras, pectinas,

ácidos orgânicos e matérias corantes e os compostos inorgânicos, representados pelas cinzas.

Por outro lado, o melado de cana, é definido pela Anvisa (2005) como “produto obtido pela concentração do caldo de cana-açúcar (*Saccharum officinarum*) ou a partir da liquefação do açúcar mascavo”.

O melado de cana é um adjunto muito adequado para substituir parte do malte no processo de fermentação, uma vez que é caracterizado por ser rico em carboidratos e micronutrientes, altamente disponíveis para a levedura. A proporção de 25% de melado é interessante visto que pode reduzir o custo de produção, sem alterar muito a proporção de malte, fundamental para uma cerveja de qualidade. Além disso, é uma proporção que já é muito utilizada em cervejarias, sendo que também pode agregar características sensoriais interessantes ao produto final.

O objetivo deste estudo foi o de produzir cervejas *ale* e *lager* utilizando melado de cana como adjunto, caracterizar suas propriedades químicas e sensoriais, inclusive após o envelhecimento, comparando com a cerveja puro malte.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A fabricação das cervejas, os equipamentos de alta tecnologia, a infraestrutura e a caracterização das bebidas foram disponibilizados pelo “Laboratory of Enzyme, Fermentation and Brewing Technology” (EFBT) na Universidade KU Leuven - Campus KAH0 Sint Lieven, Ghent, na Bélgica. Materiais para a produção da cerveja (malte, água, cervejeira, lúpulo, leveduras) foram fornecidos por este instituto. O melado de cana foi adquirido no Brasil pela empresa Caseiro e Natural Alimentos Ltda – ME, Biguaçu – Santa Catarina.

2.1. Ensaio de fermentação em pequena escala

Nove ensaios de cervejas *ale* e nove ensaios de cervejas *lager* foram feitos em pequena escala (200 g) com diferentes proporções de mosto de malte e melado de cana: 100, 95, 85, 75, 65, 55, 45, 35 e 25 % de mosto de malte, suplementado com 0, 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65 e 75% de melado de cana, respectivamente, sendo todos eles na concentração de 16°P.

Foi preparada uma solução de melado de cana pela diluição do mesmo com água até a concentração de 16°P. A concentração foi determinada utilizando o instrumento Anton Paar DMA com um dispositivo de medição de densidade 4500 (Anton Paar Benelux, Gentbrugge, Bélgica) e a solução foi submetida a autoclavagem durante 15 minutos e 0,5 bar de pressão, em frasco de Duran de 1 L.

O mosto de malte foi preparado em um banho de brassagem (Binaler & Hobein) seguindo um esquema padrão de tempo/temperatura de mosturação para a hidrólise do amido: 64°C durante 30 minutos, 72°C durante 10-20 minutos e 78°C durante 1 minuto. Cada copo do banho de brassagem continha 100 g de malte pilsen moído (10 mm), 350 g de água, e 300 mg/L de cloreto de cálcio (Merck). Para verificar a sacarificação do amido do malte, foi realizado o teste com uma solução de iodo (I_2/KI ; 0,25%) no mosto após 10 minutos à temperatura de 72°C.

Após a brassagem, todo o mosto obtido foi filtrado utilizando papel de filtro com 320 mm (Whatman), e uma amostra (50 mL) foi coletada para ser medido no equipamento

Anton Paar Alcolyser, a fim de se obter o valor de extrato. Os conteúdos de mosto foram ajustados com água até atingir 16°P.

O mosto de malte foi fervido numa autoclave, durante 60 minutos a 1,0 bar, em garrafas de vidro de 250 mL. Após a fervura, as garrafas foram colocadas em água fria e, em seguida, a quantidade correta de mosto de malte foi pesada em cada nova garrafa esterilizada, juntamente com a solução de melado de cana, somando 200 g em diferentes proporções, tal como especificado anteriormente.

Foi adicionado extrato de iso- α -ácido (Botanix, Paddock Wood, Reino Unido) em cada garrafa para se obter um amargor de 20 IBU e leveduras secas comerciais foram inseridas nas garrafas em uma concentração de 1 g/L. Para as cervejas *ale*, a levedura utilizada foi a linhagem S-04 (Fermentis) e a fermentação foi conduzida a uma temperatura de 22°C. Para as cervejas *lager*, a levedura utilizada foi a W-34/70 (Fermentis) e a temperatura de fermentação foi de 12°C.

Durante as fermentações, amostras foram coletadas de cada garrafa a cada 24 horas. Os valores de extrato foram determinados por um medidor de densidade Anton Paar DMA 35N (Anton Paar Benelux, Gentbrugge, Bélgica), assim como o conteúdo de aminoácido livre (FAN). No final das fermentações, todas as garrafas foram acondicionadas a 0°C, em câmara fria, para iniciar a maturação por 2 semanas.

Ao final da maturação, todas as cervejas foram centrifugadas durante 10 minutos a 9000 rpm (Hettich, Universal 320R) e os conteúdos foram armazenados em recipientes diferentes para análises posteriores (FAN, pH, cor, compostos fenólicos totais, álcoois superiores, ésteres, extrato original, extrato aparente, extrato real, atenuação aparente, atenuação real, teor de álcool).

2.2. Ensaio de cerveja em escala piloto (50 L)

Quatro cervejas foram preparadas em quantidades de 50 L cada, em duplicata, sendo duas cervejas do tipo *ale* e duas cervejas do tipo *lager*. Para as cervejas *ale*, 75% de mosto de malte foi suplementado com 25% de melado de cana. Além disso, duas cervejas do tipo *ale* foram elaboradas com 100% de mosto de malte, utilizada como controle. O mesmo procedimento foi aplicado para as cervejas do tipo *lager*.

O mosto de malte a 16°P foi preparado de acordo com De Rouck (2013) e a solução de melado de cana foi preparada conforme descrito no item 2.1., porém em quantidades maiores, e também atingindo a concentração de 16°P.

O mosto de malte foi preparado na inovadora planta piloto de 5 hL, utilizando as seguintes condições: 84 kg de malte Pilsen finamente moído em um moinho de disco úmido (Meura) e misturado com 1,84 hL de água, com adição de CaCl_2 (80 mg/L de Ca^{2+}) e, aproximadamente, 400 mL de solução de ácido láctico (30%, v/v). Para o início da mosturação, o pH foi ajustado para 5,2 e o perfil de tempo/temperatura foi de 64°C por 30 minutos, 72°C por 20 minutos e 95°C, por 1 minuto, com elevação da temperatura em 1°C/min. A filtração foi feita em um filtro de camada fina, específico para grãos finamente moídos; e conforme o mosto foi atingindo a tina de fervura, 0,2 mg/L de íons de Zn^{2+} (ZnCl_2) foram adicionados, bem como lúpulo na forma de pellets, da variedade Hallertau Magnum, destinados a atingir 20 mg/L de iso- α -ácidos no mosto acabado. A clarificação do mosto foi feita através de *whirlpool* em um tanque aberto na qual o mosto levou 6 minutos para o preenchimento, 20 minutos de repouso e mais 20 minutos de esvaziamento em temperatura de 95°C; após o resfriamento e aeração, o mosto alcançou uma densidade original de 16°P.

Em seguida, 100 L deste mosto foi lançado em dois fermentadores cilindro-cônicos (50 L em cada um deles), com inoculação de levedura na concentração de 10^7 células/mL; cuja linhagem de levedura para produção de cerveja do tipo *ale* utilizada foi a S-04 (Fermentis), com hidratação em água estéril durante 1 hora, com um volume de 10 vezes o peso da levedura seca. A mesma quantidade de mosto foi utilizada para a produção de cerveja do tipo *lager*, com a linhagem W-34/70 (Fermentis).

Além disso, parte deste mosto foi misturado com 25% de solução de melado de cana (16°P) em dois fermentadores cilindro-cônicos de 50 L e utilizando as mesmas leveduras. A fermentação primária foi conduzida a 12°C para as cervejas *lager* e 22°C para as do tipo *ale*. A maturação foi feita por 15 dias a 0°C e a filtração da cerveja foi feita utilizando folhas de kieselguhr/celulose (tamanho de poro de 1 μm) e saturação de CO_2 até 5,6 g/L. Para o engarrafamento, foi utilizado o equipamento com filtro de contra pressão (monobloco, Cimec, Itália), utilizando dupla pré-evacuação com injeção de CO_2 e água quente antes do preenchimento com cerveja (níveis finais de oxigênio: abaixo de 50 $\mu\text{g/L}$).

2.3. Análises

2.3.1. Análises “padrão” das cervejas

Extrato original, extrato aparente, extrato real, atenuação aparente, atenuação real, e teor alcóolico das cervejas foram medidos no equipamento Anton Paar Beer Alcoyser, em combinação com um medidor de densidade DMA 4500 M (Anton Paar Benelux, Gentbrugge, Bélgica). Os teores de oxigênio dissolvidos das cervejas foram medidos com um eletrodo de oxigênio InTap4000 portable oxygen analyser (Mettler Toledo, Elscolab) e os níveis de dióxido de carbono foram determinados com base em medições de temperatura e de pressão nesse mesmo equipamento.

As seguintes análises das cervejas foram realizadas de acordo com métodos EBC: cor: 9,6; FAN: 9,10; polifenóis totais: 9,11; estabilidade da espuma, utilizando o medidor NIBEM-T (Haffmans, Venlo, Países Baixos): 9,42; turbidez a frio: análise de turbidez onde a cerveja foi mantida durante pelo menos 24 horas a 0°C (Haffmans VOS ROTA 90 turbidity meter, 90° light scatter, Venlo, Holanda); TRAP (Potencial reativo total antioxidante): método de acordo com Araki et al. (1999).

2.3.2. Determinação de açúcares

Os açúcares foram determinados utilizando o equipamento HPLC- DP1-DP9. Antes das análises, as proteínas foram removidas das amostras de cerveja por precipitação com reagente Carrez. Assim, 20 µL de reagente de Carrez I (106 g de ferrocianeto de potássio triidratado ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) em 1000 mL de água), 20 µL de reagente de Carrez II (220 g de acetato de zinco diidratado ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) e 30 mL de ácido acético foram adicionados a 1 mL de cerveja previamente desgaseificada.

Após centrifugação a 11000 x g durante 5 minutos, as amostras de 20 µL foram injetadas em HPLC Waters 717. A quantificação dos açúcares foram obtidos utilizando uma coluna Nucleosil 100-5 NH_2 (250 x 4 mm de diâmetro interno; Macherey Nagel, Düren, Alemanha), que foi mantida a 30°C. Uma mistura de água/acetonitrila (33/67; v/v) foi utilizada como fase móvel utilizando uma bomba (Waters 616), com fluxo de 1 mL/min.

Os componentes foram detectados por um detector de índice de refração Waters 2414. A calibração foi realizada utilizando uma mistura de glicose e maltose, nas

concentrações de 250 mg/L, 500 mg/L e 1000 mg/L de cada um dos componentes, respectivamente. Fatores de resposta relativos, em comparação com a maltose, foram determinados da maltotriose até a maltoheptaose e utilizados para a quantificação. A maltooctaose foi quantificada usando o mesmo fator de resposta da maltoheptaose.

2.3.3. Determinação de aldeídos

Os aldeídos voláteis da cerveja foram determinados de acordo com Vesely et al. 2003, utilizando-se de micro extração em fase sólida (HS-SPME) com fibras de PFBOA (o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzilo)hidroxilamina) e os componentes foram separados e detectados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CGC/MS) (Dual Stage Quadrupole (DSQ™ II) GC/MS sistema (Interscience Benelux)).

O DSQ™ II foi acoplado ao GC Ultra (Interscience Benelux) equipado com um amostrador automático CTC-PAL, com um injetor revestido de vidro estreito (0,5 mL de volume), e uma coluna capilar de sílica RTX-1 (40 m x 0,18 mm de diâmetro interno, 0,2 µm de espessura, Restek, Interscience Benelux). O processamento de dados foi realizado por meio do sistema de dados XCalibur™ (Thermo Electron Corporation).

2.3.4. Determinação de ésteres e álcoois superiores

As extrações de ésteres voláteis e álcoois superiores das cervejas foram determinados segundo Malfiet et al., 2008, com realização de micro extração em fase sólida (HS-SPME) durante 30 minutos a 40°C, utilizando uma fibra de 65 µm (PDMS-DVB). Os componentes foram separados e detectados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CGC/MS) (Dual Stage Quadrupolo (ITQ 1100), sistema GC/MS (Interscience Benelux). O ITQ 1100 foi acoplado a um ThermoFinnigan Trace GC (Interscience Benelux) equipado com um amostrador automático Combi-PAL, um injetor com um revestimento de vidro de entrada estreita (0,5 mL de volume), e uma coluna capilar de sílica fundida RTX-1 (40 m x 0,18 mm de diâmetro interno e 0,2 mm de espessura, Restek, Interscience Benelux).

O hélio foi o gás de arraste, a um fluxo de 0,8 mL/min. A temperatura do injetor foi de 230°C, em modo *split* 1:2. A temperatura da coluna foi mantida a 40°C durante 3

minutos, depois aumentada para 200°C a 6°C/min, seguida por um aumento até 250°C, a uma taxa de 15°C/min, e finalmente mantida a 250°C durante 3 minutos.

O processamento dos dados cromatográficos foi realizado utilizando o sistema de dados Xcalibur™ (Thermo Electron Corporation). Para cada componente, uma curva de calibração foi feita a fim de quantificar cada componente presente nas cervejas.

2.3.5. Determinação de iso- α -ácidos

A determinação de iso- α -ácido foi determinada segundo Malfiet et al., 2008. A separação e a quantificação de iso- α -ácidos foi realizada num UPLC Acquity (Waters, Milford, EUA), que consiste de um detector PDA, forno, bomba de solvente binário, e uma coluna Acquity UPLC C18 1,8 μ m HSS (2,1 mm de diâmetro interno x 150 mm, Waters, EUA). Para o processamento dos dados, foi utilizado o software Empower 2.

As condições cromatográficas foram as seguintes: eluente A: água mili-Q ajustada a pH 2,80 com H₃PO₄ (85%, Merck, Darmstadt, Alemanha); eluente B: CH₃CN de grau HPLC (Novasol, Bélgica). Eluição: isocrática utilizando 52% (v/v) de solvente B e 48% (v/v) de solvente A. Tempo de análise: 35 minutos. Fluxo: 0,5 mL/min. Temperatura da coluna: 35°C. Detecção de UV: 270 nm (iso- α -ácidos). A relação trans/cis de iso- α -ácidos (T/C-ratio) está relacionada com as medidas de concentrações de trans- e cis- isocohumulone e trans- e cis- isohumulona.

2.3.6. Determinação do perfil de aminoácidos

A determinação dos aminoácidos foi feita segundo De Rouck (2013). O sistema de separação Acquity Ultra Performance LC (UPLC) foi utilizado para quantificar os aminoácidos livres nas cervejas. Antes da derivatização dos aminoácidos, as proteínas foram removidas. Assim, 20 μ L de reagente de Carrez I (106 g de ferrocianeto de potássio trihidratado (K₄Fe(CN)₆.3H₂O em 1000 mL de água), 20 μ L de reagente de Carrez II (220 g de acetato de zinco dihidratado (Zn(CH₃COO)₂.2H₂O) e 30 μ L de ácido acético foram adicionados a 1 mL de cerveja. Depois disso, a amostra foi centrifugada num microtubo de Eppendorf de 2 mL durante 5 minutos. A derivatização das amostras foi feita utilizando o pacote Waters AccQ-Tag Ultra Química. A reação da derivatização requer a diluição com um tampão de borato, reação com ACQ, seguido de inativação do excesso de agente de

derivatização. O pacote de derivatização de aminoácido Ultra AccQ-Tag, fornecido pela Waters continha todos os reagentes necessários.

A separação dos aminoácidos foi realizada utilizando o equipamento UPLC Acquity (Waters, Milford, EUA), que consiste de um detector PDA, forno, bomba de solvente binário, e uma coluna ultra-AccQ TagTM (2,1 mm de diâmetro interno x 100 mm; Waters, EUA). O processamento dos dados foi feito pelo software Epower 2.

As condições cromatográficas foram as seguintes: AccQ-Tag Ultra Eluent A concentrado (diluído 10 vezes) (Waters, Milford, EUA); AccQ-Tag Ultra Eluent B (Waters, Milford, EUA). Eluição: gradiente de eluição de acordo com Waters AccQ-Tag Ultra method. Tempo de análise: 9,5 minutos. Fluxo: 0,7 mL/min. Temperatura da coluna: 60°C.

2.3.7. Determinação de diacetil

O diacetil foi extraído por micro extração em fase sólida (SPME) com uma fibra de PFBHA (o-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil) cloridrato de metil-hidroxilamina) e os componentes foram separados e detectados por cromatografia/espectrometria de massa (CGC/MS) (Dual Stage Quadrupole (DSQTM II) GC/MS sistema (Interscience Benelux)). Estes parâmetros, juntamente com todos os outros que não são mencionados aqui, foram os mesmos conforme detalhado para as determinações de aldeídos. A corrida em cromatografia gasosa levou 28 minutos no total. Para o programa do forno, o tempo inicial de 2 minutos realizou-se a 50°C, seguido por um aumento de 6°C/min, até 250°C (mantida durante 5 minutos). O diacetil tem um tempo de retenção de aproximadamente 18,8 min. A injeção ocorreu a 250°C. A temperatura da fonte foi de 175°C e o benzaldeído foi utilizado como um padrão interno.

2.3.8. Avaliação sensorial de cervejas envelhecidas

As quatro cervejas elaboradas sem ou com 25% de melado de cana foram envelhecidas no escuro por 90 dias a 30°C, acondicionadas em garrafas da cor âmbar, em uma sala com temperatura controlada. Foi feita uma avaliação sensorial da deterioração do sabor por um painel treinado de 10 julgadores, conforme a escala citada por Malfiet et al. (2008).

Os entrevistados foram convidados a dar pontuações totais após degustar amostras de cerveja envelhecidas, sem revelar a identidade das amostras (0: fresca; 2: muito pouco envelhecida; 4: fracamente envelhecida; 6: claramente envelhecida; 8: fortemente envelhecida - Intragável).

2.4. Análise estatística dos resultados

Os dados experimentais foram plotados no software 8.0 OriginPro® (OriginLab Corporation) e os resultados das análises foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para a comparação das médias foi aplicado o teste de Tukey, ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Ensaio de fermentação em pequena escala

Os resultados para o consumo de extrato de cervejas *ale* durante a fermentação, em pequena escala, com diferentes proporções de melado de cana no mosto de malte são mostrados na Figura 55.

Figura 55 – Consumo de extrato durante a fermentação por leveduras *ale* em um mosto 16°P, contendo diferentes proporções de malte, suplementadas com melado de cana, a 22°C.

100% de mosto de malte; 95% do mosto de malte e 5% de melado de cana; 85% do mosto de malte e 15% de melado de cana; 75% do mosto de malte e 25% de melado de cana; 65% do mosto de malte e 35% de melado de cana; 55% do mosto de malte e 45% de melado de cana; 45% do mosto de malte e 55% de melado de cana; 35% do mosto de malte e 65% de melado de cana; 25% de mosto de malte e 75% de melado de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota-se que, no início da fermentação, o consumo de extrato foi maior em cervejas com proporções mais elevadas de mosto de malte. No entanto, no final da fermentação, cervejas com proporções mais elevadas de melado de cana obtiveram os valores mais baixos de extrato residual, mas, em qualquer caso, o extrato foi consumido ao longo do tempo.

O consumo de extrato de cervejas *lager* durante a fermentação, em pequena escala, com diferentes proporções de melado de cana é representada na Figura 56.

Figura 56 – Consumo de extrato durante a fermentação por leveduras *lager* em mosto 16°P, contendo diferentes proporções de malte, suplementadas com melado de cana, a 12°C.

100% de mosto de malte; 95% do mosto de malte e 5% de melado de cana; 85% do mosto de malte e 15% de melado de cana; 75% do mosto de malte e 25% de melado de cana; 65% do mosto de malte e 35% de melado de cana; 55% do mosto de malte e 45% de melado de cana; 45% do mosto de malte e 55% de melado de cana; 35% do mosto de malte e 65% de melado de cana; 25% do mosto de malte e 75% de melado de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Observa-se a mesma situação das cervejas do tipo *ale*, com um maior consumo de extrato em cervejas com maior proporção de malte no início da fermentação. No entanto, o processo fermentativo realizou-se em um período de tempo mais longo, uma vez que a fermentação de cervejas *lager* ocorre a uma temperatura mais baixa, levando mais tempo para fermentar.

O conteúdo de FAN neste estudo também foi determinado ao longo das fermentações, como mostrado na Figura 57 para cervejas *ale* e na Figura 58 para cervejas *lager*, com diferentes proporções de mosto de malte, suplementadas com melado de cana.

Figura 57 – Conteúdo de FAN durante a fermentação pela levedura *ale* em mosto 16°P a 22°C, em mosto de malte suplementado com diferentes proporções de melado de cana.

100% de moste de malte; 95% do mosto de malte e 5% de melado de cana; 85% do mosto de malte e 15% de meladode cana; 75% do mosto de malte e 25% de melado de cana; 65% do mosto de malte e 35% de melado de cana; 55% do mosto de malte e 45% de melado de cana; 45% do mosto de malte e 55% de melado de cana; 35% do mosto de malte e 65% de melado de cana; 25% de mosto de malte e 75% de melado cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 58 – Conteúdo de FAN durante a fermentação pela levedura *lager* em mosto 16°P a 22°C, em mosto de malte suplementado com diferentes proporções de melado de cana.

100% de moste de malte; 95% do mosto de malte e 5% de melado de cana; 85% do mosto de malte e 15% de meladode cana; 75% do mosto de malte e 25% de melado de cana; 65% do mosto de malte e 35% de melado de cana; 55% do mosto de malte e 45% de melado de cana; 45% do mosto de malte e 55% de melado de cana; 35% do mosto de malte e 65% de melado de cana; 25% de mosto de malte e 75% de melado cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

A importância do FAN para a nutrição da levedura durante a fermentação tem sido reconhecida (KLOSE et al., 2011) e, em ambos os casos do presente estudo, observou-se que os níveis FAN diminuíram ao longo dos fermentações, sendo que as cervejas com maiores níveis de malte tinham níveis mais elevados de FAN.

Para as fermentações de cervejas do tipo *ale*, a queda do conteúdo FAN ocorreu rapidamente dentro das primeiras 24 horas, diminuindo gradualmente até ao final do processo. Por outro lado, em cervejas *lager*, o conteúdo da FAN diminuiu gradualmente ao longo das fermentações e alcançaram níveis mais elevados do que as cervejas *ale*.

Os componentes nitrogenados do mosto influenciam a formação de turbidez, retenção de espuma e na estabilidade biológica de cervejas, e também são essenciais para a reprodução das leveduras (JONES; PIERCE, 1964).

As leveduras não podem utilizar complexos materiais nitrogenados para o crescimento, como as proteínas, a menos que elas sejam primeiro hidrolisadas em aminoácidos simples, dipeptídeos ou talvez tripeptídeos. Uma pequena quantidade de nitrogênio utilizável (coletivamente referidos como FAN) é liberado durante a mosturação, mas este montante não é suficiente para sustentar a fermentação em um ritmo mais rápido, especialmente quando altas concentrações de açúcares estão sendo fermentadas (THOMAS; INGLEDEW, 1990).

Após o esgotamento da fonte de nitrogênio, a proliferação das células de levedura cessa. Assim, a quantidade de FAN no mosto afeta o número de células de levedura em proliferação. Quando um número menor de células de levedura consumir a mesma quantidade de fonte de carbono, a atividade das células tem que ser mantida por aumento da temperatura. No entanto, fermentação em alta temperatura pode resultar em concentrações elevadas de compostos orgânicos voláteis. Portanto, é importante conhecer as características da produção para a biossíntese de compostos voláteis (KOBAYASHI; SHIMIZU; SHIOYA, 2008).

Após duas semanas de maturação, a 0°C, análises adicionais foram realizados nas cervejas finais. A Tabela 39 apresenta dados sobre o teor de álcool (% v/v), extrato real (% p/p), extrato aparente (% p/p), atenuação real (%), atenuação aparente (%), e pH das cervejas do tipo *ale* finais com diferentes proporções de mosto de malte e melado de cana de açúcar.

Tabela 39 – Dados de cervejas *ale* após maturação (2 semanas, 0 ° C).

	Álcool (%v/v)	Extrato real (%p/p)	Extrato aparente (%p/p)	Grau real de fermentação (%)	Grau aparente de fermentação (%)	pH
100%*	7,38	5,56	2,98	68,19	81,93	4,27
95%	7,46	5,45	2,84	68,87	82,79	4,20
85%	7,54	5,00	2,43	70,09	84,33	4,03
75%	7,71	4,94	2,24	71,66	86,34	3,97
65%	7,89	4,70	1,93	73,14	88,21	3,90
55%	8,04	4,41	1,59	74,74	90,26	3,81
45%	8,31	3,98	1,06	77,28	93,51	3,68
35%	8,54	3,58	0,58	79,59	96,48	3,60
25%	8,77	3,00	0,30	81,22	98,98	3,55

*Porcentagem de mosto de malte.

Os teores de álcool e os valores das atenuações reais e aparentes aumentaram com a utilização do melado de cana, devido às grandes quantidades de açúcares fermentescíveis presentes no adjunto. De acordo com Briggs et al. (2004), as leveduras preferem assimilar monossacarídeos, dissacarídeos e oligossacarídeos. A cana de açúcar é incomum entre as plantas devido ao armazenamento de sacarose ao invés de compostos poliméricos, tais como amido, proteínas ou lípidos (WU; BIRCH, 2007).

Os valores de extratos real e aparente e de pH diminuem com a adição de melado de cana. Os dados de conteúdo de álcool (% v/v), extrato real (% p/p), extrato aparente (% p/p), atenuação real (%), atenuação aparente (%), e o pH de cervejas *lager* com diferentes proporções de malte e melado de cana estão inseridos na Tabela 40.

Tabela 40 – Dados de cervejas *lager* após maturação (2 semanas, 0 ° C).

	Álcool (% v/v)	Extrato real (% p/p)	Extrato aparente (% p/p)	Grau real de fermentação (%)	Grau aparente de fermentação (%)	pH
100%*	6,88	5,45	2,87	68,32	81,22	4,75
95%	7,47	5,42	2,80	69,03	82,98	4,67
85%	7,65	5,06	2,38	71,00	85,49	4,53
75%	7,95	4,81	2,04	72,80	87,74	4,40
65%	7,89	4,28	1,51	74,98	90,61	4,21
55%	8,25	4,23	1,34	76,02	91,87	4,13
45%	8,29	4,19	1,29	76,26	92,17	4,10
35%	8,64	3,65	0,63	79,42	96,22	4,03
25%	8,72	3,46	0,41	80,42	97,51	3,95

*Porcentagem de mosto de malte.

Os teores de álcool aumentaram com a adição de melado de cana em cervejas *lager* e também os valores das atenuações reais e aparentes de fermentação. Com a adição de melado de cana, as cores das cervejas finais em comparação com as cervejas puro malte, podem ser observadas na Figura 59, para cervejas *ale* e na Figura 60, para as cervejas *lager*.

Figura 59 – Cores finais de cervejas *ale* com diferentes proporções de mosto de malte, suplementadas com melado de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 60 – Cores finais de cervejas *lager* com diferentes proporções de mosto de malte, suplementadas com melado de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Todas as cervejas *ale*, com diferentes proporções de malte e melado, apresentaram cores mais escuras, quando comparadas com as mesmas proporções de cervejas *lager*.

Após a maturação, compostos fenólicos e atividade antioxidante foram analisados em cervejas *ale* e *lager*. A Figura 61 mostra uma comparação dos valores de compostos fenólicos totais (TPC) nas cervejas com diferentes proporções de malte e melado em cervejas *lager* e *ale*.

Figura 61 – Comparação entre os compostos fenólicos totais em cervejas *ale* e *lager*, com diferentes proporções de mosto de malte, suplementadas com melado de cana (Média $\pm$ Desvio Padrão). Diferença significativa na mesma proporção de malte é indicado com * ($\alpha = 0,05$).

Fonte: Arquivo pessoal.

Na maioria dos casos, as cervejas *lager* apresentaram níveis mais elevados de compostos fenólicos totais; e os maiores teores também foram verificados em cervejas com maiores quantidades de mosto de malte.

Os compostos fenólicos ou polifenóis são de particular interesse para os fabricantes de cerveja, porque eles desempenham um papel importante no processo de fermentação, atrasando, retardando ou mesmo evitando os processos de oxidação (GUIDO et al., 2005). Há uma tendência de minimizar o uso de aditivos na fabricação de cerveja devido a preocupações dos consumidores e severas regulamentações. Como resultado, a atenção deve ser voltada para a proteção dos antioxidantes endógenos das matérias prima da cerveja, ou seja, na cevada e no lúpulo, sendo que cerca de 80% dos compostos fenólicos presentes na cerveja são derivados do malte de cevada, e o restante do lúpulo (ZHAO et al., 2008).

Os níveis de polifenóis nas cervejas também dependem da malteação e dos demais processos de produção da cerveja. Dados da literatura mostram que o processo de fabricação de cerveja tem um impacto considerável sobre o conteúdo de compostos fenólicos e da atividade antioxidante nas cervejas, principalmente devido às reações sofridas pelos polifenóis (LEITAO et al., 2012).

Os polifenóis são considerados os principais antioxidantes naturais nas matérias primas e nas cervejas. Eles podem reagir como antioxidantes em três formas: (1) como armadilhas de radicais livres; (2) como inibidores das lipoxigenases; (3) agentes quelantes que sequestram íons metálicos de transição, tais como ferro e cobre (MIKYŠKA et al., 2002). A Tabela 41 indica que os maiores valores para as atividades antioxidantes estão presentes em cervejas *lager*.

De acordo com dados da literatura (SYRYN et al, 2007; MALFLIET et al, 2008), uma clara relação é notada entre os conteúdos de polifenóis e o poder redutor das cervejas.

Tabela 41 – Atividade antioxidante de cervejas *ale* e *lager* com diferentes proporções de mosto de malte, suplementadas com melado de cana (Média $\pm$ Desvio Padrão). Diferença significativa na mesma linha é indicado com * ($\alpha = 0,05$).

Amostras	TRAP (mM Asc. Eq.) ¹		
	<i>ale</i>	<i>lager</i>	
100%	1.39 $\pm$ 0.02	1.46 $\pm$ 0.01	*
95%	1.42 $\pm$ 0.00	1.43 $\pm$ 0.00	*
85%	1.38 $\pm$ 0.01	1.44 $\pm$ 0.01	*
75%	1.37 $\pm$ 0.01	1.47 $\pm$ 0.01	*
65%	1.31 $\pm$ 0.01	1.40 $\pm$ 0.01	*
55%	1.34 $\pm$ 0.01	1.48 $\pm$ 0.01	*
45%	1.33 $\pm$ 0.01	1.49 $\pm$ 0.01	*
35%	1.35 $\pm$ 0.01	1.48 $\pm$ 0.01	*
25%	1.37 $\pm$ 0.01	1.48 $\pm$ 0.00	*

¹TRAP (potencial antioxidante reativo total) e Asc. Eq. (equivalente de ácido ascórbico).

Os resultados analíticos para os teores de ésteres e álcoois superiores das cervejas *ale* estão apresentados na Tabela 42. Os níveis de ésteres são mais elevados em cervejas *ale* do que em cervejas *lager*, com exceção do hexanoato de etila, que estava em maiores concentrações em cervejas *lager*. Este composto, nas cervejas *ale*, diminui com a adição de melado de cana e manteve níveis similares nas diferentes cervejas *lager* elaboradas.

A produção de cervejas de baixa fermentação em menores temperaturas (abaixo de 14°C) resulta em produtos mais pobres em aroma e sabor. Já as temperaturas mais elevadas elevam a taxa de metabolismo da levedura, porém, a influência quantitativa de uma mudança de temperatura será diferente para cada reação bioquímica, alterando o equilíbrio de compostos de sabor e aroma (ŠMOGROVIČOVÁ; DOMENY, 1999).

Houve uma variação nas quantidades dos ésteres avaliados nas cervejas *ale* e *lager* com diferentes proporções de mosto de malte e melado de cana.

Cervejas com sabor frutado tornam-se indesejáveis quando as concentrações de ésteres são demasiadamente elevadas. Os ésteres mais representativos nas cervejas são o acetato de etila, acetato de isoamila, caproato de etila, caprilato de etila e feniletilacetato (VERSTREPEN et al., 2003).

Dentre os ésteres, o acetato de etila está normalmente presente em concentrações mais elevadas e provoca um sabor frutado, com sabor semelhante a solvente. Existem dados experimentais que sugerem correlações entre o conteúdo de acetato de etila e acetato de isoamila, no entanto, as correlações são afetadas por vários fatores ambientais, incluindo oxigênio, ácidos graxos insaturados, açúcares fermentáveis, e nitrogênio (KOBAYASHI et al., 2006).

Em geral, os ésteres podem ser biossintetizados de diferentes maneiras. Eles podem ser formados através de reações químicas, mas essas taxas de reação são muito lentas para elevar as quantidades de ésteres nas cervejas. Outra via é a biossíntese na célula de levedura a partir de álcool e das diferentes formas de acil-Coenzima A (CoA). A forma mais comum de acil-CoA é o acetil-CoA. Se o acetil-CoA está envolvido na formação de um éster, um acetato é formado. Diferentes formas de acil-CoA levam à formação de ésteres etílicos de ácidos graxos. Em cervejas, os principais ésteres são acetato de etila, acetato de isoamila, feniletilacetato e ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia curta (C6-C10) (MARIOTTI; TOMÉ; MIRAND, 2008).

Álcoois superiores e ésteres voláteis são subprodutos metabólicos que contribuem para a regulação do metabolismo intermediário da levedura durante a fermentação (GUIDO et al., 2004). Uma das principais características da fermentação e da maturação para o sabor da cerveja é o equilíbrio das concentrações de todos os compostos voláteis. Entre eles, os álcoois superiores são os compostos organolépticos mais abundantes na cerveja, o que contribui, juntamente com os acetatos para o sabor global das cervejas (EDEN et al., 2001). Os álcoois superiores mais importantes nas cervejas são o etanol, 2-metilpropanol, 2-metil-butanol, 3-metil-butanol, e 2-feniletanol (VANDERHAEGEN et al., 2006).

Os álcoois superiores são compostos de aroma muito importantes para a cerveja. A sua formação pode ocorrer de dois modos diferentes. Uma delas é a via “de novo” para a síntese de carboidratos através de piruvato, no qual aminoácidos são sintetizados. Por esse meio, são formados α -ceto ácidos, que são os precursores dos álcoois superiores. A

segunda via, também conhecida como via de Ehrlich, é a formação de α -ceto ácidos através de transaminação de aminoácidos. Álcoois superiores também podem ser biossintetizados a partir de α -ceto ácidos por descarboxilação dos aldeídos correspondentes e posterior redução à álcoois (KLOSE et al., 2011).

Análises foram realizadas em todas as cervejas produzidas e os dados encontram-se na Tabela 42 para *ale* e na Tabela 43 para *lager*. Em todos os casos, o principal álcool superior foi o 3-metil-1-butanol. Nas cervejas *ale*, alguns álcoois superiores aumentaram com a concentração de melado de cana, tal como isobutanol, 3-metil-butanol, e 2-metil-butanol, e as quantidades destes componentes foram maiores quando comparados com as cervejas *lager*.

Tabela 42 – Análises de cervejas *ale* (16°P), com diferentes proporções de mosto de malte, suplementadas com melado de cana (Média ± Desvio Padrão).

		100%*	95%	85%	75%	65%	55%	45%	35%	25%
<i>n</i> -Propanol	mg/L	24,5 ± 12,9	31,5 ± 9,0	22,4 ± 3,7	19,1 ± 5,9	22,4 ± 2,7	19,9 ± 1,5	26,0 ± 0,1	17,7 ± 2,0	13,5 ± 1,3
Acetato de etila	mg/L	28,8 ± 0,8	29,0 ± 0,2	31,4 ± 3,9	33,8 ± 3,2	37,0 ± 4,5	34,0 ± 1,7	30,6 ± 4,9	27,4 ± 3,5	26,0 ± 0,1
Iso-butanol	mg/L	35,8 ± 3,6	39,1 ± 2,4	38,7 ± 6,4	39,9 ± 1,8	43,8 ± 3,3	43,7 ± 3,3	50,2 ± 5,3	56,8 ± 3,2	54,8 ± 0,7
3-Metil-1-butanol	mg/L	87,0 ± 5,3	89,0 ± 6,0	97,5 ± 19,9	103,9 ± 18,3	121,0 ± 13,8	125,1 ± 6,3	145,5 ± 5,2	166,9 ± 11,1	162,0 ± 0,1
2-Metil-1-butanol	mg/L	25,7 ± 0,4	25,9 ± 0,1	29,7 ± 6,9	31,4 ± 5,6	35,8 ± 4,1	34,9 ± 1,3	41,2 ± 1,8	45,6 ± 3,9	45,9 ± 0,4
Acetato de isobutila	µg/L	164,6 ± 31,7	161,8 ± 26,0	196,5 ± 17,2	209,3 ± 21,4	225,5 ± 31,5	189,5 ± 1,1	190,6 ± 11,5	237,5 ± 9,1	156,5 ± 4,8
Butanoato de etila	µg/L	123,4 ± 6,9	124,2 ± 0,0	131,7 ± 2,4	144,2 ± 5,2	147,1 ± 20,4	138,8 ± 0,9	127,7 ± 11,3	149,1 ± 6,7	108,0 ± 1,3
Acetato de isoamila	µg/L	2445,7 ± 317,6	2479,3 ± 294,3	2948,3 ± 756,2	3096,6 ± 712,6	4054,2 ± 504,8	3895,1 ± 79,6	3685,3 ± 40,1	4481,1 ± 266,1	2581,5 ± 8,0
Hexanoato de etila	µg/L	4,3 ± 0,6	4,0 ± 0,2	4,2 ± 0,4	4,3 ± 0,3	3,9 ± 0,2	3,2 ± 0,2	2,1 ± 0,1	1,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Octanoato de etila	µg/L	306,9 ± 17,9	308,2 ± 25,5	315,3 ± 8,7	334,7 ± 2,6	313,4 ± 40,0	277,2 ± 5,9	312,2 ± 14,3	259,3 ± 21,5	203,3 ± 12,8
Feniletilacetato	µg/L	1080,8 ± 303,1	1095,3 ± 324,5	1434,0 ± 617,4	1831,7 ± 1082,5	2141,8 ± 281,2	1664,7 ± 34,7	641,4 ± 97,5	457,4 ± 276,3	488,9 ± 66,2
Decanoato de etila	µg/L	35,7 ± 0,5	34,1 ± 1,7	36,7 ± 9,4	34,2 ± 6,6	31,1 ± 4,3	27,5 ± 2,0	29,0 ± 1,4	27,9 ± 3,3	18,9 ± 1,2

*Porcentagem de mosto de malte.

Tabela 43 – Análises de cervejas *lager* (16°P), com diferentes proporções de mosto de malte, suplementadas com melado de cana (Média ± Desvio Padrão).

		100%*	95%	85%	75%	65%	55%	45%	35%	25%
<i>n</i> -Propanol	mg/L	16,2 ± 0,0	13,4 ± 3,1	19,6 ± 0,0	24,8 ± 2,9	11,7 ± 0,6	13,6 ± 1,9	17,6 ± 1,1	17,1 ± 1,8	18,1 ± 1,5
Acetato de etila	mg/L	15,4 ± 0,0	16,6 ± 0,5	20,2 ± 0,4	21,6 ± 0,2	13,0 ± 0,1	16,7 ± 0,6	18,7 ± 0,6	19,3 ± 0,5	20,9 ± 0,0
Iso-butanol	mg/L	14,1 ± 0,2	14,7 ± 1,6	19,8 ± 1,0	21,1 ± 1,0	11,8 ± 0,1	12,9 ± 0,1	19,0 ± 0,3	14,8 ± 1,0	17,3 ± 0,2
3-Metil-1-butanol	mg/L	47,3 ± 0,0	53,8 ± 1,9	67,7 ± 2,8	72,5 ± 1,6	47,5 ± 0,3	53,9 ± 1,2	68,3 ± 1,2	68,8 ± 3,1	69,2 ± 1,7
2-Metil-1-butanol	mg/L	13,7 ± 0,0	15,2 ± 0,4	19,4 ± 1,3	20,6 ± 0,2	12,7 ± 0,2	15,2 ± 0,4	18,7 ± 0,2	18,1 ± 0,5	18,8 ± 0,1
Acetato de isobutila	µg/L	16,8 ± 0,03	23,9 ± 0,8	35,7 ± 0,8	38,2 ± 1,3	24,9 ± 0,6	31,6 ± 2,2	30,4 ± 1,2	36,0 ± 1,8	34,4 ± 1,7
Butanoato de etila	µg/L	98,9 ± 1,0	97,3 ± 1,6	128,8 ± 2,6	138,6 ± 7,1	84,4 ± 0,4	115,4 ± 8,3	137,0 ± 4,4	141,1 ± 3,4	154,8 ± 0,2
Acetato de isoamila	µg/L	371,0 ± 1,2	543,4 ± 7,6	845,5 ± 17,8	820,9 ± 1,3	551,5 ± 22,4	718,9 ± 38,1	634,8 ± 6,6	811,2 ± 7,1	909,4 ± 28,3
Hexanoato de etila	µg/L	19,7 ± 0,3	21,5 ± 0,0	21,6 ± 0,3	21,3 ± 0,1	20,8 ± 0,2	20,7 ± 0,2	20,5 ± 0,0	20,6 ± 0,2	20,4 ± 0,1
Octanoato de etila	µg/L	77,3 ± 2,2	101,8 ± 13,8	140,8 ± 19,1	135,3 ± 11,5	85,4 ± 1,0	93,5 ± 9,7	116,3 ± 2,2	154,8 ± 9,9	199,3 ± 29,4
Feniletilacetato	µg/L	174,7 ± 5,0	210,2 ± 14,1	333,8 ± 12,7	310,0 ± 13,3	214,6 ± 10,7	235,3 ± 13,4	238,4 ± 19,2	217,4 ± 4,2	199,6 ± 5,4
Decanoato de etila	µg/L	12,0 ± 0,9	12,4 ± 2,4	16,7 ± 2,2	14,3 ± 1,4	8,9 ± 0,2	10,5 ± 1,0	17,3 ± 1,3	23,8 ± 1,4	34,5 ± 0,4

*Porcentagem de mosto de malte.

3.2. Ensaio em escala piloto (50 L)

Os resultados das análises das quatro diferentes cervejas frescas, do tipo *ale* e do tipo *lager*, com ou sem adição de melado de cana são apresentados na Tabela 44.

As cervejas apresentaram teores de etanol entre 6,73% e 7,12% (v/v), sendo que a maioria das cervejas produzidas no mundo tem teor alcoólico em torno de 3 a 6% (v/v). Enquanto uma cerveja mais “fraca” contém cerca de 2 a 3% de álcool, uma cerveja “média” tem cerca de 5% e uma cerveja “forte” tem cerca de 6 a 12% de álcool (SOHRABVANDI; MORTAZAVIAN; REZAEI, 2011). Dessa forma, as cervejas do presente estudo, são classificadas como “forte”.

Os valores de extrato aparente variaram entre 2,27 e 3,56 g/100 g e os valores de pH ficaram entre 4,05 e 4,47, com valores mais baixos para as cervejas contendo melado de cana. Para as cervejas com adição de melado, o valores do grau aparente de fermentação (GAF) foram maiores devido a presença de quantidades mais elevadas de açúcares fermentescíveis. As cervejas produzidas com 100% de mosto de malte não foram capazes de alcançar as mesmas atenuações finais e valores alcóolicos das cervejas produzidas com melado de cana.

As cervejas do tipo *ale* apresentaram valores mais elevados de turbidez e para a estabilidade de espuma, os melhores valores foram para a cerveja *ale* com adição de melado e para a cerveja puro malte do tipo *lager*.

Há controvérsias quando se trata da espuma da cerveja, pois determinados consumidores não apreciam cerveja com espuma, alegando que pouca ou nenhuma espuma no copo representa uma maior quantidade de líquido a ser ingerida. Além disso, o hábito de se consumir a cerveja “estupidamente gelada” não permite um desprendimento suficiente de bolhas de gás carbônico do líquido, levando a pouca formação de espuma. Contudo, no processo de produção, os cervejeiros tem o teor de espuma como um parâmetro de qualidade e procuram atender aos consumidores que apreciam a cerveja com espuma. Além do aspecto visual, são atribuídas à espuma as funções de isolamento térmico (isola o líquido frio do ambiente mais quente) e de barreira contra a volatilização rápida dos aromas da cerveja (MATTOS, 2007).

A espuma da cerveja é formada por bolhas de gás carbônico envolvidas por proteínas, que são, especificamente, de peso molecular de aproximadamente 13 kDa e

acima de 40 kDa. Além do tamanho específico, possuem características hidrofóbicas, conferidas pela presença de aminoácidos hidrofóbicos em sua estrutura primária. O elevado peso molecular aliado à hidrofobicidade faz com que essas proteínas fiquem localizadas próximas às bolhas de gás carbônico desprendidas do líquido, formando uma rede tridimensional que retém as bolhas de gás e dificulta o escoamento do líquido (cerveja). Portanto, maiores quantidades de bolhas de gás carbônico e maiores quantidades dessas proteínas favorecem a formação de espuma (MATTOS, 2007).

O conteúdo de CO₂ das cervejas estava dentro das especificações e o teor de O₂ foi mais alto na cerveja *lager* com adição de melado de cana. O nível de oxigênio total em cada garrafa deve ter níveis abaixo de 0,1 mg/L (100 µg/L) utilizando modernos equipamentos de enchimento, e ainda assim o envelhecimento oxidativo da cerveja permanece difícil de controlar (BAMFORTH, 2000). Todas as garrafas do presente estudo estavam abaixo desse limite.

As concentrações de diacetil foram maiores nas cervejas *lager* e, em relação à adição de melado de cana, as cervejas com este adjunto apresentaram níveis mais elevados. O diacetil é produzido durante a fermentação primária e a sua concentração é muitas vezes utilizada como um índice para saber o término da fermentação ou maturação (PETERSEN et al., 2004).

Duas dicetonas vicinais, 2,3-butanodiona (diacetil) e 2,3-pentanodiona tem valores limiares sensoriais muito baixos. Seus odores, que se assemelham ao de manteiga, pode ser reconhecido em concentrações tão baixas quanto 0,1 mg/L. O diacetil e a 2,3-pentanodiona também são compostos de aroma importantes da cerveja fresca. A sua redução só é possível com a ajuda das células de levedura, que reduzem o diacetil à acetoína e depois em butanediol. O butanediol tem um limiar sensorial muito alto e não é reconhecível nas cervejas (KLOSE et al., 2011). Neste estudo, todas as cervejas elaboradas apresentaram concentrações de diacetil abaixo do seu limiar.

Tabela 44 – Análises das diferentes cervejas *ale* e *lager*, com ou sem adição de melado de cana (Média $\pm$ Desvio Padrão). Mesmas letras na mesma fileira significa que não houve diferença significativa ao nível de significância de 5% no teste de Tukey.

		<i>ale</i>		<i>lager</i>	
		100% malte	75% malte	100% malte	75% malte
Etanol	v/v %	6,73 ^b $\pm$ 0,00	7,12 ^a $\pm$ 0,05	7,09 ^{ab} $\pm$ 0,04	7,12 ^a $\pm$ 0,18
Extrato aparente	g/100g	3,56 ^a $\pm$ 0,22	2,27 ^c $\pm$ 0,04	3,05 ^b $\pm$ 0,06	2,45 ^c $\pm$ 0,02
Extrato original	g/100g	15,88 ^a $\pm$ 0,20	15,39 ^a $\pm$ 0,13	16,05 ^a $\pm$ 0,15	15,49 ^a $\pm$ 0,40
GAF	%	77,62 ^c $\pm$ 1,10	85,23 ^a $\pm$ 0,15	81,00 ^b $\pm$ 0,17	84,21 ^a $\pm$ 0,51
pH	-	4,47 ^b $\pm$ 0,08	4,05 ^c $\pm$ 0,07	4,61 ^a $\pm$ 0,03	4,36 ^b $\pm$ 0,02
Estabilidade da espuma	NIBEM-T (s)	128,0 ^b $\pm$ 12,7	149,0 ^{ab} $\pm$ 11,3	192,0 ^a $\pm$ 24,0	97,3 ^b $\pm$ 2,2
Turbidez fria (0°C)	EBC	1,70 ^b $\pm$ 0,14	2,00 ^a $\pm$ 0,18	1,30 ^c $\pm$ 0,12	1,35 ^d $\pm$ 0,03
CO ₂	g/L	6,3 ^a $\pm$ 0,2	6,0 ^a $\pm$ 0,1	5,8 ^a $\pm$ 0,1	6,1 ^a $\pm$ 0,4
O ₂ (D.O.)	μg/L	70,0 ^c $\pm$ 0,2	72,3 ^b $\pm$ 0,1	74,0 ^b $\pm$ 0,1	97,0 ^a $\pm$ 2,1
Diacetil	μg/L	16,3 ^d $\pm$ 4,0	24,6 ^c $\pm$ 2,0	48,6 ^b $\pm$ 0,4	67,7 ^a $\pm$ 0,8

A Tabela 45 mostra os resultados das análises das cervejas frescas e envelhecidas por 90 dias a 30 ° C.

Tabela 45 – Análises “padrão” de diferentes cervejas frescas e envelhecidas, do tipo *ale* e *lager*, com ou sem adição de melado de cana (Média $\pm$ Desvio Padrão). Mesmas letras na mesma fileira significa que não houve diferença significativa ao nível de significância de 5% no teste de Tukey.

			<i>ale</i>		<i>lager</i>	
	Amostra		100% malte	75% malte	100% malte	75% malte
Cor	EBC	fresca	12,7 ^b $\pm$ 0,7	17,2 ^a $\pm$ 0,8	12,4 ^b $\pm$ 0,0	14,6 ^{ab} $\pm$ 0,8
		envelhecida	13,4 ^c $\pm$ 0,6	18,4 ^a $\pm$ 0,9	13,5 ^{bc} $\pm$ 0,0	16,7 ^a $\pm$ 0,7
FAN	(mg/L)	fresca	135,2 ^b $\pm$ 8,2	49,9 ^c $\pm$ 6,4	182,0 ^a $\pm$ 0,0	114,0 ^b $\pm$ 5,3
		envelhecida	144,6 ^b $\pm$ 14,8	55,4 ^c $\pm$ 9,7	198,4 ^a $\pm$ 0,0	118,1 ^b $\pm$ 8,5
Polifenóis	mg/L	fresca	205,68 ^c $\pm$ 1,08	226,87 ^b $\pm$ 0,78	246,82 ^a $\pm$ 0,00	184,09 ^c $\pm$ 32,27
		envelhecida	208,08 ^c $\pm$ 7,54	227,35 ^b $\pm$ 3,19	239,44 ^a $\pm$ 0,00	180,81 ^c $\pm$ 30,73
Flavonóides	mg/L	fresca	39,3 ^a $\pm$ 3,0	43,3 ^a $\pm$ 0,8	39,2 ^a $\pm$ 0,0	26,3 ^b $\pm$ 3,8
		envelhecida	35,6 ^a $\pm$ 2,5	37,4 ^a $\pm$ 1,5	34,7 ^a $\pm$ 0,0	21,9 ^b $\pm$ 2,0
TRAP	mM Asc. Eq.	fresca	1,43 ^a $\pm$ 0,06	1,55 ^a $\pm$ 0,02	1,52 ^a $\pm$ 0,00	1,43 ^a $\pm$ 0,09
		envelhecida	1,42 ^a $\pm$ 0,13	1,50 ^a $\pm$ 0,01	1,50 ^a $\pm$ 0,00	1,40 ^a $\pm$ 0,12
Iso- α -ácido	mg/L	fresca	20,21 ^a $\pm$ 2,26	16,63 ^b $\pm$ 1,38	20,32 ^a $\pm$ 0,08	20,48 ^a $\pm$ 0,32
		envelhecida	19,75 ^a $\pm$ 1,16	14,50 ^b $\pm$ 0,63	18,49 ^a $\pm$ 0,24	18,17 ^a $\pm$ 0,66

As cervejas com adição de melado de cana são mais escuras do que as cervejas puro malte, e a cor fica mais intensa com o processo de envelhecimento por 90 dias a 30°C. A cerveja *ale* com adição de 25% de melado de cana apresentou o maior valor.

Cervejas *lager* têm níveis mais elevados de FAN do que as cervejas *ale*, e cervejas puro malte também têm níveis mais elevados do que as cervejas com adição de melado de cana. Com o envelhecimento, o teor de FAN aumentou ligeiramente em todas as cervejas.

O teor de FAN disponível no mosto está diretamente associado com a formação de sabores e aromas, pois estão relacionados com a produção de ésteres e álcoois superiores que são de suma importância na produção de cerveja com boas características organolépticas (BOULTON; QUAIN, 2006).

A evolução dos polifenóis totais durante o envelhecimento é menos pronunciada. Em cervejas *ale*, o conteúdo aumentou ligeiramente, e em cervejas *lager* houve uma ligeira diminuição. Em todas as cervejas, o conteúdo de flavanóides e do poder redutor diminuíram com o envelhecimento.

Os valores finais de amargor foram inferiores em cervejas com melado de cana e, obviamente os valores apresentaram um ligeiro decréscimo com o envelhecimento, porque como relatado em diversos estudos, é comum ocorrer uma significativa degradação de iso- α -ácidos durante o envelhecimento da cerveja, devido à deterioração oxidativa desses compostos (MALFIET et al., 2008).

O sabor de uma cerveja é de vital importância para a aceitação do consumidor. Tem sido demonstrado que o tipo de malte tem um impacto importante sobre o perfil de sabor. Neste estudo, as cervejas foram produzidas a partir de malte de cevada e também com adição de melado de cana, em condições idênticas, de modo a enfatizar a influência do adjunto sobre o perfil de sabor da cerveja. Durante a fermentação alcoólica, a levedura excreta não somente etanol e dióxido de carbono, mas também uma grande variedade de compostos aromáticos incluindo álcoois superiores, ésteres, compostos carbonílicos, compostos de enxofre e os ácidos graxos (KLOSE et al., 2011).

Perfis quantitativos de ésteres (Tabela 46) e álcoois superiores (Tabela 47) foram feitos para cervejas *ale* e *lager*, frescas e envelhecidas, com 100% de mosto de malte, e com 75% de mosto de malte suplementadas com 25% de melado de cana.

Tabela 46 – Concentração de ésteres em cervejas *ale* e *lager* frescas e envelhecidas, com ou sem adição de melado de cana.

		Acetato de etila (mg/L)	Acetato de isobutila (µg/L)	Butanoato de etila (µg/L)	Acetato de isoamila (µg/L)	Hexanoato de etila (µg/L)	Octanoato de etila (µg/L)	Feniletilacetato (µg/L)	Decanoato de etila (µg/L)
ale	puro malte - fresca	43,07 ± 1,28	265,00 ± 0,01	175,00 ± 0,01	2820,00 ± 0,01	206,50 ± 0,00	425,00 ± 0,02	955,00 ± 0,06	135,00 ± 0,04
	puro malte - envelhecida	39,88 ± 1,73	225,00 ± 0,01	160,00 ± 0,01	1965,00 ± 0,02	208,50 ± 0,00	375,00 ± 0,02	795,00 ± 0,01	115,00 ± 0,04
	25% melado - fresca	39,77 ± 0,85	380,00 ± 0,01	140,00 ± 0,00	4325,00 ± 0,11	142,50 ± 0,01	270,00 ± 0,06	1395,00 ± 0,08	95,00 ± 0,05
	25% melado - envelhecida	35,17 ± 1,46	320,00 ± 0,00	135,00 ± 0,01	3510,00 ± 0,04	126,00 ± 0,01	240,00 ± 0,04	1185,00 ± 0,02	75,00 ± 0,04
lager	puro malte - fresca	46,68 ± 1,50	63,40 ± 0,01	176,27 ± 0,01	2532,77 ± 0,07	205,36 ± 0,00	447,70 ± 0,02	751,69 ± 0,07	145,1 ± 0,01
	puro malte - envelhecida	43,17 ± 1,99	54,12 ± 0,00	163,40 ± 0,00	2049,51 ± 0,03	199,90 ± 0,00	366,62 ± 0,01	552,05 ± 0,01	119,18 ± 0,00
	25% melado - fresca	32,63 ± 0,98	40,00 ± 0,00	150,00 ± 0,00	1785,00 ± 0,12	221,50 ± 0,00	475,00 ± 0,02	520,00 ± 0,00	126,50 ± 0,03
	25% melado - envelhecida	32,34 ± 1,12	40,00 ± 0,00	150,00 ± 0,00	1545,00 ± 0,08	220,50 ± 0,00	405,00 ± 0,01	410,00 ± 0,00	105,00 ± 0,02

Tabela 47 – Concentração de álcoois superiores em cervejas *ale* e *lager* frescas e envelhecidas, com ou sem adição de melado de cana.

		Iso-butanol (mg/L)	3-metil-1- butanol (mg/L)	2-metil-1- butanol (mg/L)
<i>ale</i>	puro malte - fresca	27,85 ± 1,91	60,56 ± 0,06	14,77 ± 0,24
	puro malte - envelhecida	29,89 ± 4,40	65,13 ± 7,11	16,27 ± 2,63
	25% melado - fresca	52,46 ± 2,31	106,11 ± 3,87	29,58 ± 1,47
	25% melado - envelhecida	50,95 ± 1,99	105,21 ± 1,50	29,40 ± 0,91
<i>lager</i>	puro malte - fresca	16,78 ± 1,91	60,02 ± 0,21	15,33 ± 0,01
	puro malte - envelhecida	15,91 ± 1,22	58,68 ± 1,22	15,05 ± 0,31
	25% melado - fresca	14,08 ± 1,18	63,21 ± 4,15	12,82 ± 0,31
	25% melado - envelhecida	13,40 ± 0,00	63,95 ± 4,19	13,02 ± 0,52

As cervejas *ale* frescas contiveram as maiores concentrações de aroma, tanto na forma de ésteres quanto na forma de álcoois superiores. As cervejas *ale* com adição de melado de cana contiveram quantidades superiores em relação às cervejas puro malte.

Os níveis de 3-metil-butanol (para álcoois superiores) e acetato de etila (para ésteres) foram os mais elevadas em todas as cervejas em questão. De acordo com Meilgaard (1975), os álcoois superiores proporcionam sabores alcoólicos e adocicados à cerveja e são comumente encontrados em cervejas do tipo *lager*. No entanto, no presente estudo, os níveis mais elevados foram encontrados nas cervejas *ale*. A cervejas puro malte do tipo *ale* apresentou concentrações consideravelmente mais baixas de álcoois superiores do que a cerveja com melado de cana. Uma composição de aminoácidos diferentes nos mostos com adição de melado de cana pode ter tido uma influência sobre a formação de álcoois superiores.

Os álcoois superiores são os precursores de sabor da maioria dos ésteres, e a sua síntese está ligada à produção de proteína (BRIGGS et al., 2004). Dentre os ésteres e álcoois superiores mais abundantes na cerveja estão o acetato de etila e acetato de isoamila, e os álcoois amílico e iso-butanol (YUNIS; STEWART, 1998). Neste estudo, são detectados níveis elevados de acetato de etila e acetato de isoamila.

O acetato de etila contribui para um sabor frutado, e acetato de isoamila contribui com sabor de banana. No entanto, quando presentes em concentrações excessivas, a sua influência é frequentemente negativa perante o aceite pelo consumidor. Esses ésteres são normalmente encontrados em cervejas produzidas a partir de mostos com concentrações médias de 10-12°P, em concentrações menores do que os valores limiares de 30 e 2 mg/L, respectivamente (CASEY et al., 1985). Neste estudo, o acetato de etila está acima do seu limiar e para as concentrações de acetato de isoamila nas cervejas finais, estavam na concentração normalmente encontrada em cervejas *lager* comerciais.

Perfis quantitativos de aldeídos também foram feitos para cervejas *ale* e *lager*, frescas e envelhecidas, com ou sem adição de melado de cana de açúcar (Tabela 48). Os aldeídos investigados podem ser classificados em aldeídos provenientes da degradação Strecker (2-metil-propanal, 2- e 3-metilbutanal, metional, benzaldeído, fenilacetaldeído), aldeídos formados durante as reações de Maillard (furfural), e aldeídos formados a partir da oxidação de lípidos (hexanal e trans-2- nonenal).

Tabela 48 – Concentração de aldeídos em cervejas *ale* e *lager* frescas e envelhecidas, com ou sem adição de melado de cana.

		2-metil	2-metil	3-metil	(E)-2-					
		propanal	butanal	butanal	metional	fenilacetaldeído	hexanal	furfural	benzaldeído	nonenal
		(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)
ale	puro malte - fresca	17,6 ± 1,6	2,9 ± 0,0	6,6 ± 0,1	12,7 ± 0,6	32,6 ± 2,0	1,0 ± 0,0	11,8 ± 0,1	2,2 ± 0,1	0,04 ± 0,00
	puro malte - envelhecida	106,1 ± 0,0	7,4 ± 1,7	12,4 ± 6,4	28,9 ± 12,0	57,5 ± 19,9	1,5 ± 0,8	233,4 ± 61,3	2,6 ± 0,9	0,06 ± 0,03
	25% melado - fresca	9,8 ± 0,2	3,8 ± 0,6	8,7 ± 1,1	11,9 ± 2,3	38,0 ± 3,1	0,7 ± 0,1	30,2 ± 4,2	1,6 ± 0,1	0,05 ± 0,00
	25% melado - envelhecida	37,9 ± 1,6	6,9 ± 1,7	10,7 ± 4,8	17,4 ± 1,7	44,6 ± 7,2	1,3 ± 0,5	432,4 ± 37,6	2,3 ± 0,7	0,08 ± 0,03
lager	puro malte - fresca	13,1 ± 0,3	2,9 ± 0,1	8,0 ± 0,2	11,3 ± 0,1	35,6 ± 1,4	0,5 ± 0,1	21,2 ± 1,3	0,9 ± 0,0	0,03 ± 0,00
	puro malte - envelhecida	182,2 ± 18,3	10,9 ± 0,3	17,7 ± 0,9	38,3 ± 3,6	71,3 ± 4,4	1,0 ± 0,1	245,4 ± 5,7	1,4 ± 0,1	0,03 ± 0,01
	25% melado - fresca	10,0 ± 1,1	3,2 ± 1,0	9,0 ± 3,0	9,3 ± 3,1	36,9 ± 14,6	0,6 ± 0,1	29,8 ± 6,2	1,0 ± 0,1	0,04 ± 0,00
	25% melado - envelhecida	81,5 ± 9,5	9,7 ± 2,5	16,5 ± 7,0	22,7 ± 0,4	69,4 ± 16,5	1,3 ± 0,5	449,8 ± 99,7	1,5 ± 0,5	0,06 ± 0,03

Cervejas frescas geralmente contêm baixas concentrações de aldeídos, abaixo dos seus respectivos limiares de sabor. O aumento nas concentrações coincidem com o aparecimento e intensidade de “aromas e sabores de envelhecimento” (JASKULA-GOIRIS et al., 2011). Por exemplo, o aldeído trans-2-nonenal tem sido citado como o mais importante composto de envelhecimento em cervejas *lager*, porque a sua concentração foi vista repetidamente aumentar durante o envelhecimento em níveis acima do limiar de sabor (cerca de 0,03 µg/L de acordo com Saison et al., 2009), gerando sabores de “papelão” no produto final (BAERT et al., 2012).

Ao longo dos anos, tornou-se claro que o trans-2-nonenal é apenas uma parte de um grande quadro de compostos responsáveis pelo sabor e aroma de envelhecimento (BAERT et al., 2012).

Neste estudo, todas as cervejas frescas tiveram baixos teores de aldeídos e apenas com o envelhecimento esses níveis aumentaram. Alguns aldeídos, tais como 2-metilbutanal, furfural, metional e fenilacetaldeído não mostraram níveis significativamente diferentes nas cervejas.

Perfis detalhados dos aminoácidos são apresentadas na Figura 62 para cervejas *ale* e na Figura 63 para cervejas *lager*. Nas cervejas *ale*, exceto para a cisteína, todos os aminoácidos estão em concentrações mais elevadas nas cervejas puro malte. O mesmo ocorre para as cervejas *lager* e, ao comparar cervejas *ale* e *lager*, nota-se que as cervejas *lager* têm níveis mais elevados de aminoácidos.

Figura 62 – Perfil de aminoácidos em cervejas *ale* com mosto puro malte (100%) e suplementado com 25% de melado de cana.

His: histidina; Asn: asparagina; Ser: serina; Gln: glutamina; Arg: arginina; Gly: glicina; Asp: ácido aspartico; Glu: ácido glutâmico; Thr: treonina; Ala: alanina; Pro: prolina; Cys: cistina + cisteína; Lys: lisina; Tyr: tirosina; Met: metionina; Val: valina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Phe: fenilalanina; Trp: triptofano.

100%: cerveja elaborada com 100% de malte; 75%: cerveja elaborada com 75% de malte e 25% de melado de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 63 – Perfil de aminoácidos em cervejas *lager* com mosto puro malte (100%) e suplementado com 25% de melado de cana.

His: histidina; Asn: asparagina; Ser: serina; Gln: glutamina; Arg: arginina; Gly: glicina; Asp: ácido aspartico; Glu: ácido glutâmico; Thr: treonina; Ala: alanina; Pro: prolina; Cys: cistina + cisteína; Lys: lisina; Tyr: tirosina; Met: metionina; Val: valina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Phe: fenilalanina; Trp: triptofano.

100%: cerveja elaborada com 100% de malte; 75%: cerveja elaborada com 75% de malte e 25% de melado de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Como esperado, a prolina é o aminoácido em maior quantidade em todas as cervejas analisadas. Concentrações de prolina aumentam durante a germinação da cevada, atingindo um nível máximo após 8 dias. Além disso, a prolina presente no mosto é pouco utilizada sob condições anaeróbias e lentamente absorvida sob condições aeróbicas (PERPÈTE et al., 2005). Esta é a razão de se encontrar maiores concentrações de prolina nas amostras de cervejas *lager* e *ale* do presente estudo, sendo maior a concentração em cervejas *lager*.

Os aminoácidos podem influenciar o sabor das cervejas, uma vez que levedura metaboliza esses compostos por vários mecanismos bioquímicos. De todos os processos bioquímicos que ocorrem na produção de cerveja, a proteólise é de fundamental importância, uma vez que produz aminoácidos livres e peptídeos que contribuem para o sabor ou são precursores comportando-se como substratos para várias reações enzimáticas. Os aminoácidos também influenciam a cor do produto final, uma vez que durante a etapa de fervura, os aminoácidos, em especial a prolina, reage com a maltose (reação de Maillard), produzindo o maltol e produtos coloridos conhecidos como melanoidinas. Finalmente, os aminoácidos afetam a estabilidade biológica das cervejas finais (POMILIO et al., 2010).

A utilização de xaropes de açúcar como adjunto reduz o teor de aminoácidos disponíveis, e uma menor taxa específica de crescimento leva a uma baixa taxa de absorção de aminoácidos. Esse tipo de fermentação está associada também com um padrão (anormal) modificado de absorção de açúcares e níveis alterados de produção de alguns compostos de sabor (PIDDOCKE et al., 2009). Por isso, é muito importante utilizar adjuntos de forma consciente e não exagerada.

3.3.Avaliação sensorial das cervejas envelhecidas

A avaliação sensorial das quatro cervejas envelhecidas (90 dias a 30°C) foi realizada por um painel de provadores treinados. Os entrevistados foram convidados a dar uma pontuação geral sobre o envelhecimento, sem conhecer a identidade das cervejas. Os resultados das avaliações sensoriais estão contidos na Tabela 49. A cerveja *ale* puro malte apresentou os maiores escores globais de envelhecimento, embora verificou diferença significativa entre as amostras.

Tabela 49 – Média dos escores globais de envelhecimento das cervejas envelhecidas.

	Cervejas	90 dias a 30°C
<i>ale</i>	100% malte	4,8 ^a ± 1,1
	75% malte + 25% melado	4,3 ^a ± 1,3
<i>lager</i>	100% malte	4,2 ^a ± 1,0
	75% malte + 25% melado	4,4 ^a ± 0,9

Letras diferentes na mesma coluna implicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras pelo Teste de Tukey.

4. CONCLUSÕES

O melado de cana de açúcar contém uma grande quantidade de açúcares fermentescíveis que estão prontamente disponíveis para as leveduras, não sendo necessário adicionar o produto durante a mosturação, pois os açúcares já estão presentes em formas hidrolisadas. Consequentemente, a rica presença desses açúcares fermentescíveis levou a uma produção de cervejas com um conteúdo superior de etanol e de álcoois superiores.

As fermentações de cervejas com e sem adição do melado seguiram a mesma tendência e as principais diferenças foram valores mais baixos de pH e níveis de FAN, com teores alcólicos mais elevados para as cervejas com adição de melado. A análise de sabor destas cervejas revelou características semelhantes às de cervejas de puro malte, com algumas alterações.

Este estudo demonstrou que é perfeitamente viável preparar cervejas com a adição de 25% de melado de cana, sem quaisquer dificuldades. Além disso, diferentes proporções de melado também podem ser viáveis, agradando diferentes tipos de consumidores.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 271, de 22 de setembro de 2005. Aprova o "Regulamento técnico para açúcares e produtos para adoçar". Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ca624500474594079ba5df3fbc4c6735/RDC_271_2005.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em 25/02/2014.
- ARAKI, S., KIMURA, T., SHIMIZU, C., FURUSHO, S., TAKASHIO, M. SHINOTSUKA, K. Estimation of antioxidative activity and its relationship to beer flavor stability. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 57, p. 34-37, 1999.
- BAERT, J. J.; DE CLIPPELEER, J.; HUGHES, P. S.; DE COOMAN, L.; AERTS, G. On the origin of free and bound staling aldehydes in beer. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 60, p. 11449-11472, 2012.
- BAMFORTH, C. W. Beer quality: oxidation. **Brewer's Guardian**, v. 4, p. 31-34, 2000.
- BAMFORTH C. W. (Ed.) **Brewing**. Woodhead, Cambridge, England: Editora. 2006. p. 427-460.
- BOTELHO, B. G. **Perfil e teores de aminas bioativas e características físico-químicas em cervejas**. 2009. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, Brasil, 2009.
- BOULTON, C.; QUAIN D. **Brewing yeast and fermentation**. Oxford: Blackwell Science, 2006.
- BRASIL. Decreto n. 6871, de 04 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 05 jun. 2009. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm>. Acesso em: 30/03/2015.
- BRIGGS, D.E.; BOULTON, C.A.; BROOKES, P.A; STEVENS, R. **Brewing: science and practice**. Cambridge, England, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2004. P. 85-201.

CARVALHO, L. R.; MAGALHÃES, J. T. Avaliação da qualidade microbiológica dos caldos de cana comercializados no centro de Itabuna - BA e práticas e produção e higiene de seus manipuladores. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 31, n. 2, p. 240-247, 2007.

CASEY, G.; CHEN, E.; INGLEDEW, W. High gravity brewing: production of high levels of ethanol without excessive concentrations of esters and fusel alcohols. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 43, p. 179-182, 1985.

DE ROUCK, G. **System changes in wort production for the improvement of the flavor stability of lager beer**. 2013. 135f. Thesis (Doctor in Bioscience Engineering) – Faculty of Bioscience Engineering, KU Leuven, Belgium, 2013.

EDEN, A.; VAN NEDERVELDE, L.; DRUKKER, M.; BENVENISTY, N.; DEBOURG, A. Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 296-300, 2001.

ENGELMANN, J.; MIEDANER, H. Métodos de producción de cerveza: materias primas y aditivos de uso corriente. **Brewing and Beverage Industry Español**, n. 3, p. 10-16, 2005.

GUIDO, L. F.; RODRIGUES, P. G.; RODRIGUES, J. A.; GONCALVES, C. R.; BARROS, A. A. The impact of the physiological condition of the pitching yeast on beer flavor stability: an industrial approach. **Food Chemistry**, v. 7, p. 187-193, 2004.

GUIDO, L. F.; BOIVIN, P.; BENISMAIL, N.; GONCALVES, C. R.; BARROS, A. A. An early development of the nonenal potential in the malting process. **European Food Research and Technology**, v. 220, p. 200-206, 2005.

JASKULA-GOIRIS, B.; DE CAUSMAECKER, B.; DE ROUCK, G.; DE COOMAN, L.; AERTS, G. Detailed multivariate modeling of beer staling in commercial pale lagers. **Brewing Science**, v. 64, p. 119-139, 2011.

JONES, M.; PIERCE, J. S. Absorption of amino acids from wort by yeasts. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 70, p. 307-315, 1964.

KLOSE, Ç.; MAUCH, A.; WUNDERLICH, S.; THIELE, F.; ZARNKOW, M.; JACOB, F.; ARENDT, E. K. Brewing with 100% oat malt. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, p. 411-421, 2011.

KOBAYASHI, M.; NAGAHISA, K.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Simultaneous control of apparent extract and volatile compounds concentrations in low-malt beer fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 549-558, 2006.

KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, p. 317-323, 2008.

LEITAO, C.; MARCHIONI, E.; BERGAENTZLÉ, M.; ZHAO, M.; DIDIERJEAN, L.; MIESCH, L.; HOLDER, E.; MIESCH, M.; ENNAHAR, S. Fate of polyphenols and antioxidant activity of barley throughout malting and brewing. **Journal of Cereal Science**, v. 55, p. 318-332, 2012.

MALFLIET, S.; VAN OPSTAELE, F.; DE CLIPPELEER1, J.; SYRYN, E.; GOIRIS, K.; DE COOMAN, L.; AERTS, G. Flavor instability of pale lager beers: determination of analytical markers in relation to sensory ageing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, p. 180-192, 2008.

MARIOTTI, F.; TOMÉ, D.; MIRAND, P. P. Converting nitrogen into protein-beyond 6.25 and Jones' factors. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 177-184, 2008.

MATTOS, R. C.F. **Efeito das variáveis de transporte e estocagem sobre a estabilidade sensorial de cervejas tipo Pilsen**. 2007. 92f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas – SP, 2007.

MEILGAARD, M. C. Flavor chemistry of beer. I. Flavor interaction between principal volatiles. **Technical Quarterly of the Master Brewers Association of America**, v. 12, p. 107-117, 1975.

MIKYŠKA, A.; HRABÁK, M.; HAŠKOVÁ, D.; ŠROGL, J. The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavor and haze stability. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, p. 78-85, 2002.

PERPÈTE, P.; SANTOS, G.; BODART, E.; COLLIN, S. Uptake of amino acids during beer production: the concept of a critical time value. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 63, p. 23-27, 2005.

PETERSEN, E. E.; MARGARITIS, A.; STEWART, R. J.; PILKINGTON, P.H. Mensour, N. A. The effects of wort valine concentration on the total diacetyl profile and levels late in batch fermentations with brewing yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 62, p. 131-139, 2004.

PIDDOCKE, M. P.; KREISZ, S.; HELDT-HANSEN, H. P.; NIELSEN, K. F.; OLSSON, L. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 453-464, 2009.

POMILIO, A. B.; DUCHOWICZ, P. R.; GIRAUDO, M. A.; CASTRO, E. A. Amino acid profiles and quantitative structure–property relationships for malts and beers. **Food Research International**, v. 43, p. 965-971, 2010.

SILVA, P. H. A.; FARIA, F. C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 902-906, 2008.

SLEIMAN, M. **Determinação do percentual de malte de cevada em cervejas tipo pilsen utilizando os isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e do nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$)**. 2006. 87f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Unesp, Botucatu, SP, 2006.

ŠMOGROVIČOVÁ, D.; DÖMÉNY, Z. Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilised yeasts. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 785-794, 1999.

SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A. M.; REZAEI, K. Advanced analytical methods for the analysis of chemical and microbiological properties of beer. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 19, n. 2, p. 202-222. 2011.

STEWART, G. G. A Brewer's delight. **Chemistry and Industry**, p. 706-709, 2000.

STUPIELLO, J. P. A cana de açúcar como matéria prima. In: PARANHOS, S. B. **Cana de açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 2, p. 761-804.

SYRYN, E.; MALFLIET, S.; GOIRIS, K.; VAN OPSTAELE, F.; DE ROUCK, G.; DE COOMAN, L.; AERTS, G. An integrated analytical sensorial methodology for adequate evaluation of the flavor stability of pilsner beer. In: PROCEEDINGS OF THE

EUROPEAN BREWERY CONVENTION CONGRESS, 2007. Venice, Fachverlach Hans Carl: Nürnberg, Germany, CD ROM 2007, Contribution 100.

THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2046-2050, 1990.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. The chemistry of beer aging: a critical review, **Food Chemistry**, v. 95, p. 357-381, 2006.

VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G.; DUFOUR, J. P.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M.; PRETORIUS, I. S.; DELVAUX, F. R. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, p. 110-118, 2003.

VESELY, P.; LUSK, L.; BASAROVA, G.; SEABROOKS, J.; RYDER, D. Analysis of aldehydes in beer using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 6941-6944, 2003.

WU, L.; BIRCH, R. G. Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, p. 109-117, 2007.

YOUNIS, O.; STEWART, G. Sugar uptake and subsequent ester and higher alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 104, p. 255-264, 1998.

ZHAO, H.; FAN, W.; DONG, J.; LU, J.; CHEN, J.; SHAN, L.; LIN, Y.; KONG, W. Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. **Food Chemistry**, v. 107, p. 296-304, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Modelo do questionário a ser aplicado aos consumidores antes do teste de aceitabilidade.

Questionário de recrutamento

Nome: _____

_____ RG: _____

Idade: _____ Sexo: () feminino () masculino

Escolaridade: _____

Endereço: _____

Fone: _____

E-mail: _____

Professor() Funcionário() Aluno Pós- Graduação() Aluno Graduação() Outro()

1) Você é um consumidor de cerveja?

() sim () não

2) Qual o motivo do consumo? (Pode ter mais de uma resposta)

() saudável () agradável () necessidade () diversão/descontração ()
outros _____

3) Qual é a sua cerveja predileta?

4) Essa cerveja é predileta por causa do sabor ou por causa da marca?

5) Você sabe o que é cerveja do tipo Pilsen? Se sim, você gosta desse tipo de cerveja?

6) Qual a sua frequência de consumo de cerveja?

- () Ocasionalmente
- () Menos de 1 vez por mês
- () 1 a 2 vezes por mês
- () 1 vez por semana
- () 2 ou mais vezes por semana
- () Todos os dias
- () Outro: _____

_____, _____ de _____ de 201__

APÊNDICE B – Modelo do TCLE aplicado aos consumidores antes do teste de aceitabilidade.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Desde logo fica garantido o sigilo das informações. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Emprego do caldo de cana e do melado como adjunto de malte de cavada na produção de cervejas.

Pesquisador Responsável: Raquel Aizemberg

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): (12) 3159 5107

Pesquisador participante: João Batista de Almeida Silva

Telefones para contato: (12) 3159 5044, (12) 98116 2490

O objetivo do trabalho é desenvolver uma tecnologia de produção de cervejas utilizando como adjunto, produtos oriundos da cana de açúcar. Serão obtidas cervejas com 100; 75 e 50% de malte, complementados com 0; 25 e 50% de caldo de cana. Após a determinação de análises físico-químicas dos mostos, serão avaliadas características sensoriais das bebidas. A análise sensorial será feita em duas etapas, por meio de testes afetivos. Em um primeiro momento, será feito um teste para a escolha das melhores proporções de caldo ou melado de cana; e em outro momento, será feita análise do produto processado. As análises serão realizadas no laboratório de sensorial da Microcervejaria da EEL, em cabines individuais sob condições adequadas de iluminação e temperatura. Os testes serão realizados por consumidores comuns, convocados por intermédio de informativos distribuídos nos *campi* da Escola de Engenharia de Lorena e selecionados quando consumidores habituais do produto, superiores a 18 anos de idade. Não há nenhum risco, prejuízo, desconforto ou lesões que podem ser provocados pela pesquisa, com garantia de sigilo e direito de retirar o consentimento a qualquer tempo. Este estudo é importante porque seus resultados fornecerão informações para o desenvolvimento de um novo produto.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. Que o trabalho tem por finalidade desenvolver uma tecnologia de produção de cervejas utilizando como adjunto, cana de açúcar;
2. Que como voluntário deste estudo, terei que participar do teste de aceitação das cervejas e informar o quanto gostei ou desgostei do produto;
3. Que a minha participação como voluntário se limitará a uma seção de avaliação sensorial de aproximadamente 15 minutos em um único dia;
4. Que terei risco mínimo ao participar dessa pesquisa; já que será apenas uma seção com consumo de 40 mililitros do produto;
5. Que necessitarei comparecer ao laboratório de análise sensorial da Microcervejaria da EEL para a realização do teste de aceitação do produto;
6. Que não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;
7. Que meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;

8. Que poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum tipo de prejuízo ou penalização;
9. Eu não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa;
10. Concordo que este estudo é importante porque seus resultados fornecerão informações para o desenvolvimento de um novo produto;
11. Que em caso de qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos poderei entrar em contato com a equipe científica pelo telefone (Raquel Aizemberg, tel: 12 3159 5107 ou 12 98116 2490).

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntária(o), do estudo: **Emprego do caldo de cana e do melado como adjunto de malte de cevada na produção de cervejas.**

Nome e Assinatura do pesquisador

Consentimento da participação da pessoa como sujeito

Eu, _____,
RG _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo **Emprego do caldo de cana e do melado como adjunto de malte de cevada na produção de cervejas**, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador Raquel Aizemberg sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data _____/_____/_____

Assinatura do Voluntário _____

Assinatura do Pesquisador _____ (Raquel Aizemberg)

Assinatura do Orientador _____ (Prof. Dr. João Batista de Almeida e Silva).

APÊNDICE C – Ficha de avaliação sensorial

Nome: _____

Data: _____

Por favor, avalie a amostra codificada da esquerda para a direita e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou da mesma.

9 – gostei extremamente	Código da amostra: _____
8 – gostei muito	Notas:
7 – gostei moderadamente	Impressão global: _____
6 – gostei ligeiramente	Cor: _____
5 – nem gostei / nem desgostei	Odor : _____
4 - desgostei ligeiramente	Sabor: _____
3 – desgostei moderadamente	Aparência : _____
2 – desgostei muito	
1 – desgostei extremamente	

Assinale qual seria sua atitude quanto à compra do produto.

5 - eu certamente compraria este produto	Código da amostra: _____ ()
4 - eu provavelmente compraria este produto	_____ ()
3 - eu tenho dúvidas se compraria ou não este produto	_____ ()
2 - eu provavelmente não compraria este produto	
1 - eu certamente não compraria este produto	

Comentários: _____

APÊNDICE D – Gráficos da cinética de mostos elaborados com caldo ou melado de cana

Figura 64 – (A) Concentração de extrato ($^{\circ}\text{P}$), concentração de etanol (%v/v), crescimento celular (cel/mL) e pH e (B) Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação de mosto com 16 $^{\circ}\text{P}$ e 12 $^{\circ}\text{C}$, contendo 75% de malte e 25% de melado de cana parcialmente clarificado (Ensaio 1 do Capítulo 2).

Figura 65 – (A) Concentração de extrato ($^{\circ}\text{P}$), concentração de etanol (%v/v), crescimento celular (cel/mL) e pH e (B) Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação de mosto com 16 $^{\circ}\text{P}$ e 12 $^{\circ}\text{C}$, contendo 75% de malte e 25% de melado de cana cru (Ensaio 2 do Capítulo 2).

Figura 66 – (A) Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (%v/v), crescimento celular (cel/mL) e pH e (B) Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação de mosto com 16°P e 12°C, contendo 75% de malte e 25% de caldo de cana parcialmente clarificado (Ensaio 3 do Capítulo 2).

Figura 67 – (A) Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (%v/v), crescimento celular (cel/mL) e pH e (B) Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação de mosto com 16°P e 12°C, contendo 75% de malte e 25% de caldo de cana cru (Ensaio 4 do Capítulo 2).

Figura 68 – (A) Concentração de extrato ($^{\circ}$ P), concentração de etanol (%v/v), crescimento celular (cel/mL) e pH e (B) Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação de mosto com 16 $^{\circ}$ P e 12 $^{\circ}$ C, contendo 50% de malte e 50% de melado de cana parcialmente clarificado (Ensaio 5 do Capítulo 2).

Figura 69 – (A) Concentração de extrato ($^{\circ}$ P), concentração de etanol (%v/v), crescimento celular (cel/mL) e pH e (B) Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação de mosto com 16 $^{\circ}$ P e 12 $^{\circ}$ C, contendo 50% de malte e 50% de melado de cana cru (Ensaio 6 do Capítulo 2).

Figura 70 – (A) Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (%v/v), crescimento celular (cel/mL) e pH e (B) Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação de mosto com 16°P e 12°C, contendo 50% de malte e 50% de caldo de cana parcialmente clarificado (Ensaio 7 do Capítulo 2).

Figura 71 – (A) Concentração de extrato (°P), concentração de etanol (%v/v), crescimento celular (cel/mL) e pH e (B) Produtividade volumétrica e rendimento em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PPB01, durante a fermentação de mosto com 16°P e 12°C, contendo 50% de malte e 50% de caldo de cana cru (Ensaio 8 do Capítulo 2).